



**HAL**  
open science

# Rôle de champignons mycorhiziens à arbuscules dans le transfert du cadmium (Cd) du sol à la luzerne (*Medicago truncatula*)

Paul-Olivier Redon

► **To cite this version:**

Paul-Olivier Redon. Rôle de champignons mycorhiziens à arbuscules dans le transfert du cadmium (Cd) du sol à la luzerne (*Medicago truncatula*). Science des sols. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français. NNT : 2009NAN10015 . tel-01748490

**HAL Id: tel-01748490**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748490>**

Submitted on 29 Mar 2018

**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-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

Thèse  
présentée pour l'obtention du titre de  
Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I  
en Sciences du Sol

par Paul-Olivier REDON

**Rôle de champignons mycorhiziens à arbuscules dans le transfert  
du cadmium (Cd) du sol à la luzerne (*Medicago truncatula*)**

Soutenue publiquement le 06 Mars 2009

*Membres du jury :*

M. Thibault Sterckeman, Ingénieur de Recherche, INPL/INRA, Nancy, président du jury  
Mme Laurence Denaix, Directrice de Recherche, INRA, Bordeaux, rapporteur  
M. Stéphane Declerck, Professeur, UCL, Louvain-la-Neuve, Belgique, rapporteur  
Mme Vivienne Gianinazzi-Pearson, Directrice de Recherche, CNRS, Dijon, examinateur  
Mme Corinne Leyval, Directrice de Recherche, CNRS, Nancy, directeur de thèse

## Remerciements

*Je tiens à remercier mon laboratoire d'accueil, le LIMOS, qui pendant trois ans et demi a constitué pour moi comme une seconde famille.*

*Ma reconnaissance va en premier lieu à Corinne Leyval, ma directrice de thèse, qui m'a donné l'opportunité de venir travailler à Nancy au sein de son laboratoire et d'apprendre toutes les ficelles du métier de chercheur. Elle a su me conseiller et m'orienter pour que je mène à bien mes recherches en me laissant une grande part de liberté et de responsabilités. J'ai ainsi pu apprécier grandement la qualité de nos relations.*

*Des bonnes relations et une ambiance chaleureuse dans le bureau, c'est aussi ce qui m'a permis d'effectuer ma thèse dans les meilleures conditions. Je remercie donc énormément mes « collègues » de bureau (et personnels non permanents qui y sont passé) : Thierry Béguiristain, mon co-encadrant non officiel, merci pour tous ces bons moments passés et ta bonne humeur ; Aurélie Cébron, Marie-Paule Norini, Pierre Léglize, Cécile Taupert, j'ai été vraiment ravi de passer tout ce temps à vos côtés. Je n'oublie bien évidemment pas Geneviève Magnin (la « Jo Jo ») et sa complice Christine Friry, un grand merci, mesdames, pour toute votre aide et pour l'attention que vous m'avez porté.*

*Un clin d'œil également à tous les autres doctorants, post-docs et ater qui m'ont accompagné dans cette aventure, avant tout humaine, Jeanne Bongoua-Devisme, Emile Boulou Bi, Clarisse Balland, Arsène Sanon, Brice Louvel, Norbert Ondo, Malgorzata « Goshia » Grybos, Corinne Fesneau, Antoine Joubert, Isabelle Puskiewicz, Isabelle Auvray, Nicolas Angeli, Céline Pisapia, Judicaël Moukoumi, Remy Albrecht, Veronica Landeros, Diane Zhou, Fabien Laurent, je vous souhaite à tous bon courage pour la suite de votre carrière. Merci aux chercheurs et enseignants-*

*chercheurs, permanents du laboratoire, pour leur accueil : Christian Mustin, Patrick Bissard, Anne Poszwa, Colette Munier-Lamy, Sylvie Dousset, Jean-Pierre Boudot, Sylvie Desobry, Jacques Berthelin, François Toutain.*

*Tous mes remerciements et mon respect vont aussi aux personnels techniques pour toute leur patience et leur aide sans lesquels le laboratoire fonctionnerait beaucoup moins bien : Chantal Ginsburger, Dominique Goepper, Nadim Massouhi, Denis Merlet, Hervé Marmier, David Bisset, Géraldine Kitzinger ; encore merci pour votre aide précieuse.*

*Je tiens ensuite à grandement remercier mes rapporteurs, Laurence Denaix et Stéphane Declerck, ainsi que les autres membres du jury, Vivienne Gianinazzi-Pearson et Thibault Sterckeman, pour avoir accepté de juger mon travail.*

*Enfin, je ne peux terminer sans remercier de tout cœur mes amis et ma famille, en particulier mes parents, sans qui je ne serais pas arrivé où j'en suis aujourd'hui. Merci pour tout votre amour.*

# Sommaire

<b>Introduction générale</b> .....	3
<b>Partie 1 : État des connaissances</b> .....	9
<b>I. Les pollutions anthropiques métalliques</b> .....	9
1. Les sources de pollution.....	9
2. Les dangers de ce type de pollution .....	11
3. Chiffres et réglementations .....	12
<b>II. Effets du stress métallique sur les organismes terrestres et réponses de ces organismes</b> .....	14
1. Les effets délétères des éléments en traces métalliques.....	14
2. Les mécanismes de réponse au stress métallique.....	16
<b>III. Cas du cadmium (Cd) : un élément particulièrement étudié</b> .....	18
1. Origine, utilisations et toxicité .....	18
2. Comportement dans les sols .....	19
3. Phytodisponibilité.....	21
a. Le transfert sol-plante de Cd .....	21
b. Mécanismes moléculaires d'absorption de Cd par les plantes .....	24
c. Estimation de la phytodisponibilité du Cd .....	26
<b>IV. Les champignons mycorhiziens à arbuscules (MA)</b> .....	27
1. Taxonomie des champignons mycorhiziens.....	27
2. Fonctionnement de la symbiose mycorhizienne arbusculaire.....	31
3. Effets et protection des champignons MA .....	35
a. Amélioration de la croissance et de la nutrition des plantes .....	35
b. Effet sur la structure du sol .....	36
c. Protection contre les stress abiotiques et biotiques .....	36
<b>V. Dépolluer les sols : notion de bioremédiation</b> .....	40
1. Les différentes méthodes de dépollution.....	40
a. Les techniques physico-chimiques .....	42
b. Utilisation des organismes vivants pour la remédiation.....	43
2. Optimisation de la phytoremédiation .....	46
<b>Objectifs de l'étude</b> .....	51
<b>Partie 2 : Matériel et méthodes</b> .....	55
<b>I. Les objets d'étude</b> .....	55
1. La plante hôte .....	55
2. L'inoculum mycorhizien .....	56
3. Les substrats de culture .....	57
<b>II. Méthodes et dispositifs utilisés</b> .....	59
1. Désinfection des graines de luzerne et germination.....	59
2. Isolement des spores de champignons mycorhiziens .....	60
3. Dispositifs expérimentaux.....	60
a. Expérience 1 : cultures en pots avec différents sols contaminés.....	61
b. Expérience 2 : cultures en pots avec différents isolats de champignons MA .....	62
c. Expérience 3 : dispositif à compartiment sans sol et cinétique d'absorption.....	63
d. Expérience 4 : dispositif à compartiment latéral .....	65

4. Conditions de culture .....	67
<b>III. Analyses .....</b>	<b>68</b>
1. Biomasse végétale .....	68
2. Colonisation mycorhizienne du système racinaire.....	68
3. Mesure de la longueur des hyphes mycéliens .....	68
4. Minéralisation des végétaux et mesure de la concentration en éléments minéraux.....	69
5. Mesure du Cd radioactif.....	70
6. Analyses statistiques .....	70
<b>Partie 3: Résultats &amp; Discussion .....</b>	<b>71</b>
<b>I. Expérience 1 : Effet d'un champignon MA sur le bilan de Cd en fonction des conditions du sol .....</b>	<b>73</b>
Introduction/Objectif de l'expérience .....	73
Article.....	75
Principaux résultats .....	81
<b>II. Expérience 2 : Effets de différents isolats de champignons MA sur le transfert de Cd et de Zn à la plante .....</b>	<b>83</b>
Introduction/Objectif de l'expérience .....	83
Article.....	85
Principaux résultats .....	101
<b>III. Expérience 3 : Cinétique d'absorption du Cd par <i>Medicago truncatula</i> et contribution de la mycorhization .....</b>	<b>103</b>
Introduction/Objectif de l'expérience .....	103
Article.....	105
Principaux résultats .....	118
<b>IV. Expérience 4 : Accessibilité du champignon MA à différentes formes de Cd du sol .....</b>	<b>120</b>
Introduction/Objectif de l'expérience .....	120
Article.....	121
Principaux résultats .....	135
<b>Partie 4 : Discussion générale et perspectives.....</b>	<b>139</b>
<b>1. Influence indirecte des champignons MA sur le transfert de Cd et variabilité de l'effet mycorhizien.....</b>	<b>140</b>
<b>2. Effets directs du champignon MA sur le transfert de Cd .....</b>	<b>143</b>
<b>3. Discussion sur les objets de l'étude .....</b>	<b>145</b>
<b>4. Perspectives.....</b>	<b>147</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>153</b>
<b>Liste des figures et tableaux .....</b>	<b>185</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>191</b>
Annexe 1 .....	193
Annexe 2 .....	195
Annexe 3 .....	196
Annexe 4 .....	197
Annexe 5 .....	198

# **Introduction générale**



## Introduction

Les activités anthropiques sont la source de nombreux polluants disséminés dans l'environnement. Les éléments en traces métalliques (ETM), incluant des métaux et des métalloïdes, font partie de ces polluants à risque de préoccupation prioritaire car ce sont des éléments très toxiques et non dégradables. Leur rémanence dans l'environnement implique qu'ils s'accumulent dans les organismes et qu'il est difficile de réduire leur concentration. Les sols ont ainsi été contaminés par des polluants métalliques dont les concentrations n'ont cessé d'augmenter au cours du 20<sup>ème</sup> siècle (Nriagu et Pacyna, 1988) entraînant des effets toxiques chez les êtres vivants et perturbant le bon fonctionnement des écosystèmes. Les sols constituent des écosystèmes complexes, supports de nombreux organismes biologiques qui se retrouvent exposés à la pollution. Les microorganismes du sol et les plantes sont les premiers touchés et constituent les premiers maillons de la chaîne alimentaire qui peut à son tour être contaminée. De plus, les sols ne sont pas des ressources renouvelables, ce qui oblige à réutiliser des sites contaminés pour répondre aux besoins croissants de la société humaine. Ces besoins de réduire les risques sanitaires et de trouver des solutions pour revaloriser les sites pollués imposent d'étudier le transfert des ETM du sol vers les organismes vivants et en premier lieu vers les plantes. L'accumulation de métaux dans les végétaux doit être quantifiée si l'on veut étudier les flux dans les écosystèmes et les réseaux trophiques, et si l'on souhaite évaluer la faisabilité des méthodes naturelles de dépollution des sols (phytoremédiation).

Le transfert des ETM aux plantes dépend de nombreux paramètres abiotiques (physico-chimie du sol, minéralogie) et biotiques (plante, microorganismes). Alors que la mobilité des ETM dans les sols est fortement influencée par les paramètres du sol, en particulier le pH, les teneurs en éléments et en matière organique et la composition en minéraux, la composante biologique du sol joue aussi un rôle prépondérant. La disponibilité des ETM est en effet fortement dépendante des espèces végétales étudiées car leurs capacités de prélèvement des métaux sont variables. Ce prélèvement des ETM par la plante est par ailleurs largement influencé par les microorganismes (bactéries et champignons) qui vivent dans la rhizosphère. Les champignons symbiotiques des plantes, en particulier les champignons mycorhiziens à arbuscules (MA), jouent un rôle important dans les sols puisqu'ils colonisent la grande majorité des plantes et qu'ils sont impliqués dans le prélèvement et le transfert des éléments essentiels et non essentiels vers la plante.

Ayant coévolué avec les plantes depuis des millions d'années, les champignons MA ont établi une étroite collaboration avec leur plante hôte. Ils contribuent à la nutrition végétale en prélevant des nutriments peu disponibles pour la plante et améliorent ainsi sa croissance. Le champignon échange alors ces éléments essentiels contre des molécules carbonées (sucres), issues de la photosynthèse, indispensables à son propre développement. De plus, la colonisation mycorhizienne favorise la croissance des plantes en conditions de stress (biotiques ou abiotiques), en particulier en présence de concentrations en ETM dans le sol élevées. Par ces différentes actions dans la rhizosphère, la contribution des champignons MA au transfert des ETM aux plantes peut ainsi être importante.

Malgré les nombreuses études sur le sujet, plusieurs questions se posent encore sur le comportement des champignons MA dans les sols pollués par les ETM et sur leur rôle vis-à-vis de la plante. L'influence des champignons MA est complexe, ainsi, la distinction entre un effet direct sur le transfert des métaux et un effet indirect via une stimulation de la croissance de la plante doit encore être faite. Les effets du champignon sont-ils en relation avec sa « tolérance » aux métaux et son origine d'un sol pollué peut-il être un critère déterminant quant à son effet sur le transfert des métaux ? L'effet du champignon est-il dépendant de la biodisponibilité des ETM dans le sol ? Enfin, dans un contexte d'utilisation des plantes pour la remédiation de sols contaminés par les métaux (végétalisation, phytoextraction), la mycorhization peut-elle jouer un rôle ?

Les travaux présentés dans ce mémoire ont pour objectif d'aborder ces différentes questions pour améliorer la connaissance des interactions plantes - champignons MA - ETM dans les sols. Ils concernent l'influence d'un champignon MA dans le transfert d'un ETM, le cadmium (Cd), dans le système sol-plante avec *Medicago truncatula* comme modèle végétal. Ce manuscrit, présenté sous forme de recueil d'articles, est divisé en quatre grandes parties :

Une première partie présente l'état actuel des connaissances sur les contaminations en ETM et leurs effets sur les organismes vivants puis s'intéresse au fonctionnement de la symbiose mycorhizienne dans le contexte des sols contaminés pour terminer sur une description des techniques existantes en remédiation des sols pollués et sur l'utilisation potentielle des champignons mycorhiziens en bioremédiation.

Après une présentation des objectifs de la thèse, la deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisés au cours de ces travaux pour répondre aux questions posées.

Une troisième partie donne ensuite les résultats et les discussions des quatre expériences réalisées et présentées sous forme d'articles en anglais. La première expérience est une culture en pot de luzernes mycorhizées ou non sur quatre sols contaminés en métaux pour évaluer l'effet des conditions de sol et de la biodisponibilité de Cd sur la contribution de la mycorhization au transfert de Cd à la plante et aux percolats. Avec le même type de culture, la deuxième expérience compare les effets de cinq isolats de champignons MA sur les transferts de Cd et Zn. Dans la troisième expérience, un dispositif à compartiment contenant des substrats simplifiés est utilisé pour mesurer la capacité de sorption de Cd à court terme (24 h) de luzernes non mycorhizées et mycorhizées, et des hyphes d'un champignon MA. La quatrième expérience est une culture d'un mois dans un dispositif à compartiment pour mesurer la capacité du mycélium fongique à prélever et transporter le Cd présent sous différentes formes dans des substrats contrastés.

Enfin, la quatrième partie constitue une discussion générale synthétique qui met en relation les principaux résultats obtenus dans les différentes expériences et débouche sur une conclusion générale et les perspectives de cette étude. Le document se termine sur les références bibliographiques et quelques annexes.



# **Partie 1**

# **État des connaissances**



## État des connaissances

### I. Les pollutions anthropiques métalliques.

#### 1. Les sources de pollution

Depuis l'industrialisation des pays européens, une contamination croissante des sols en éléments en traces métalliques (ETM) est observée. Cette dénomination d'ETM, remplaçant le terme « métaux lourds », est parfois un peu floue car il n'y a pas de définition officielle. Usuellement, les ETM sont des éléments minéraux réputés toxiques, incluant des métaux et des métalloïdes, naturellement présents dans les sols et les roches en faibles concentrations (fond géochimique) (Tableau 1).

Tableau 1 : Contenu des roches en éléments en traces (en ppm) (Kabata-Pendias et Pendias, 1992).

Éléments	Roches magmatiques			Roches sédimentaires		
	Roches basiques	Roches intermédiaires	Roches acides	Roches argileuses sableuses	Grès	Carbonates
Cd	0,13-0,22	0,13	0,09-0,20	0,22-0,30	0,05	0,035
Co	35-50	1,0-10	1-7	11-20	0,3-10	0,1-3,0
Cr	170-200	15-50	4-25	60-100	20-40	5-16
Cu	60-120	15-80	10-30	40	5-30	2-10
Hg	0,0x	0,0x	0,08	0,18-0,40	0,04-0,10	0,04-0,05
Mn	1200-2000	500-1200	350-600	500-850	100-500	200-1000
Mo	1,0-1,5	0,6-1,0	1-2	0,7-2,6	0,2-0,8	0,16-0,40
Ni	130-160	5-55	5-15	50-70	5-20	7-20
Pb	3-8	12-15	15-24	18-25	5-10	3-10
V	200-250	30-100	40-90	100-130	10-60	10-45
Zn	80-120	40-100	40-60	80-120	15-30	10-25

Or, nos sociétés industrielles, grandes productrices et consommatrices de métaux, relarguent dans l'environnement des quantités considérables de ces éléments toxiques, tels que Pb, Hg, Zn, Cd, Cu et Cr. Les principales sources de pollution anthropiques de ces métaux sont les activités industrielles, minières et agricoles mais aussi les quantités croissantes de déchets domestiques (Nriagu & Pacyna, 1988) (Tableau 2).

Tableau 2 : Les sources d'éléments en traces métalliques dans l'environnement (traduit d'après Ross, 1994).

- 
1. *Mines et fonderies de métaux:*
    - a) Terrils et résidus – contamination par lixiviation et érosion éolienne (As, Cd, Hg, Pb)
    - b) Résidus dispersés par les eaux – contamination des sols suite aux crues, inondations, etc. (As, Cd, hg, Pb)
    - c) Transport des minerais – (As, Cd, Hg, Pb)
    - d) Fonderie – contaminations dues aux poussières et aérosols (As, Cd, Hg, Pb, Sb, Se)
    - e) Industrie du fer et de l'acier (Cu, Ni, Pb)
    - f) Traitement des métaux (Zn, Cu, Ni, Cr, Cd)
  
  2. *Industrie:*
    - a) Plastiques (Co, Cr, Cd, Hg)
    - b) Textiles (Zn, Al, Ti, Sn)
    - c) Microélectronique (Cu, Ni, Cd, Zn, Sb)
    - d) Traitement du bois (Cu, Cr, As)
    - e) Raffineries (Pb, Ni, Cr)
  
  3. *Retombées atmosphériques:*
    - a) Sources urbaines/industrielles, dont incinérateurs et élimination des déchets (Cd, Cu, Pb, Sn, Hg, V)
    - b) Industries pyrométallurgiques (As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Sb, Tl, Zn)
    - c) Gaz d'échappements automobiles (Mo, Pb (with Br and Cl), V)
    - d) Combustion des carburants fossiles (dont les centrales énergétiques) (As, Pb, Sb, Se, U, V, Zn, Cd)
  
  4. *Agriculture:*
    - a) Engrais (ex: As, Cd, Mn, U, V et Zn dans certains engrais phosphatés)
    - b) Lisiers (ex: As et Cu dans des lisiers de porcs et de volailles, Mn et Zn dans certains lisiers de ferme)
    - c) Chaulage (As, Pb)
    - d) Pesticides (Cu, Mn et Zn dans les fongicides, As et Pb utilisés dans les vergers)
    - e) Eaux d'irrigation (Cd, Pb, Se)
    - f) Corrosion des métaux (Fe, Pb, Zn)
  
  5. *Dépôts de déchets sur les sols:*
    - a) Boues d'épuration (Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, V, Zn)
    - b) Percolats des décharges (As, Cd, Fe, Pb)
    - c) Tas de ferrailles (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn)
    - d) Feux, cendres, etc. (Cu, Pb)
- 

Les industries métallurgiques sont des sources importantes de retombées atmosphériques qui contaminent les sols aux alentours, ainsi que les nombreux sites de stockage de déchets et les sols de friches industrielles fortement concentrés en polluants métalliques. En France, les sites pollués répertoriés, d'après la base de données BASOL (consultable sur le site internet <http://basol.environnement.gouv.fr>), sont au nombre de 4033.

Les activités minières, bien que ponctuelles, sont aussi à l'origine de fortes teneurs en ETM dans les sols et dans ce cas le risque de dissémination dans l'environnement est lié au phénomène de drainage minier. Les apports d'origine agricole sont une troisième source de contamination des sols en ETM ; les amendements organiques, les engrais phosphatés et les pesticides contiennent de grandes quantités de métaux qui s'accumulent dans les sols cultivés. Enfin, tous les déchets issus de la consommation et de la vie urbaine (gaz d'échappement, boues de stations d'épuration, composts, effluents et déchets divers) complètent la liste des apports en ETM d'origine anthropique.

## 2. Les dangers de ce type de pollution

On distingue parmi les éléments en traces métalliques, les éléments essentiels (ou oligo-éléments) tels que Cu, Zn, Se, Mo, Mn, Ni, As et les éléments non essentiels (ex : Cd, Hg, Pb). Les oligo-éléments sont nécessaires au développement des organismes vivants, ce caractère essentiel étant lié à leur rôle de cofacteurs et de biocatalyseurs dans un grand nombre de molécules biologiques. Ainsi, Cu et Zn sont fréquemment trouvés dans certaines protéines et enzymes, alors que les éléments non essentiels n'ont pas de fonctions connues et sont particulièrement toxiques. Néanmoins, même pour les oligo-éléments, des concentrations trop élevées s'avèrent toxiques pour les organismes. Ces éléments créent un stress oxydant dans les cellules où ils s'accumulent, entraînant un dysfonctionnement des organes et parfois la mort de l'organisme. L'accumulation d'ETM dans l'environnement amène ainsi à la perturbation du fonctionnement des écosystèmes naturels mais aussi des agrosystèmes. Des teneurs élevées en métaux dans les sols agricoles réduisent les rendements des cultures, ce qui est problématique face à la demande alimentaire croissante de la population mondiale. Par ailleurs, les métaux d'origine anthropique tendent à s'accumuler dans les horizons de surface et sont relativement mobiles, ils peuvent facilement être absorbés par les végétaux qui constituent le premier maillon de la chaîne alimentaire. La pollution des sols est ainsi le point de départ de la contamination des réseaux trophiques. De plus, la mobilité des ETM dans les sols et leur lixiviation peut entraîner une contamination des eaux de surfaces et des nappes phréatiques posant de sérieux problèmes sanitaires à une époque où l'eau devient une ressource rare et disputée. D'autre part, contrairement aux molécules organiques, les métaux ne sont pas dégradables et restent donc présents durablement dans l'environnement. Associé à l'aspect non renouvelable de la ressource sol, ce caractère rémanent des ETM renforce leur

dangérosité et ne laisse comme seul choix de dépollution que leur déplacement ou leur stabilisation, en veillant à réduire les sources de pollution.

### 3. Chiffres et réglementations

Parmi les 9 éléments en traces à risque pour la santé humaine que sont Cd, Pb, Hg, As, Ni, Cr, Cu, Zn, et Se, quatre éléments sont particulièrement préoccupants : le cadmium, le plomb, le mercure et l'arsenic (Bourrelier et Berthelin, 1998). Cd, Pb et Hg ont ainsi été identifiés comme « substances dangereuses prioritaires » par la commission européenne (Décision 2455/2001/CE du conseil Européen modifiant la Directive Européenne sur l'Eau 2000/60/CE). En vertu de cette directive 2000/60/CE, les états membres de l'Union Européenne sont ainsi tenus d'adopter des mesures de prévention et de contrôle de la pollution des eaux souterraines et de fixer des valeurs seuils (Directive 2006/118/CE). En France, la circulaire DCE 2006/18 du 21 décembre 2006 relative à la définition du « bon état » pour les eaux souterraines, donne ainsi des valeurs seuils provisoires pour la définition de l'état chimique des eaux souterraines (Tableau 3).

*Tableau 3 : Valeurs seuils provisoires retenues au niveau national pour la définition de l'état chimique des eaux souterraines (Circulaire DCE 2006/18).*

Paramètres	Code SANDRE	Valeurs seuils provisoires retenues au niveau national
Arsenic	1369	10 µg/l (*)
Cadmium	1388	5 µg/l
Plomb	1382	10 µg/l (**)
Mercure	1387	1 µg/l
Trichloréthylène	1977	10 µg/l
Tétrachloréthylène	1272	10 µg/l
Ammonium	1335	0,5 mg/l (*)

(\*) valeur seuil applicable uniquement aux aquifères non influencés pour ce paramètre par le contexte géologique

(\*\*) dans le cas d'un aquifère en lien avec les eaux de surface et qui les alimente de façon significative, prendre comme valeur seuil celle retenue pour les eaux douces de surface (circulaire du 28 juillet 2005) en tenant compte éventuellement des facteurs de dilution et d'atténuation

Par ailleurs, au niveau national, les premières réglementations qui ont été mises en place concernant la qualité des sols sont celles sur les épandages de boues d'épuration et les rejets d'effluents (Arrêté du 02 février 1998) (Tableau 4). Les pratiques d'épandages de boues et

d'eaux usées sur les sols agricoles pour augmenter leur teneur en matière organique sont très fréquentes, or ces déchets sont souvent riches en métaux et il est important de veiller à ne pas dépasser dans les sols des teneurs dangereuses pour la santé humaine.

Tableau 4 : Norme française relative aux boues des ouvrages de traitement des eaux usées urbaines (Arrêté du 02 février 1998).

	Teneur maximale dans les boues épandues (mg kg <sup>-1</sup> matière sèche)	Teneur maximale des sols pouvant recevoir des boues (mg kg <sup>-1</sup> matière sèche)
Cadmium	20	2
Chrome	1000	150
Cuivre	1000	100
Mercure	10	1
Nickel	200	50
Plomb	800	100
Sélénium	100	10
Zinc	3000	300

Tableau 5 : Teneurs maximales (mg kg<sup>-1</sup> de matière sèche) en plomb, cadmium et mercure autorisées dans différentes catégories d'aliments (EC n° 466/2001).

Aliment	Plomb	Cadmium	Mercure
Viande	0,1	0,05	ND
Poisson	0,2 – 0,4	0,05	1,0
Céréales et légumineuses	0,2	0,1 – 0,2	ND
Légumes	0,1 – 0,3	0,05 – 0,2	ND

Tableau 6 : Valeurs seuils dans les eaux de boissons recommandées par l'OMS (World Health Organization, 2006).

	Concentration maximale conseillée	Concentrations naturelles dans les eaux de surface
Arsenic	0,01 mg L <sup>-1</sup> (provisoire)	1-2 µg L <sup>-1</sup>
Cadmium	0,003 mg L <sup>-1</sup>	<1 µg L <sup>-1</sup>
Chrome (total)	0,05 mg L <sup>-1</sup> (provisoire)	<2 µg L <sup>-1</sup>
Cuivre	2 mg L <sup>-1</sup>	<0,005 to >30 mg L <sup>-1</sup>
Mercure	0,006 mg L <sup>-1</sup>	<0,5 µg L <sup>-1</sup>
Nickel	0,07 mg L <sup>-1</sup>	<0,02 µg L <sup>-1</sup>
Plomb	0,01 mg L <sup>-1</sup>	<5 µg L <sup>-1</sup>
Sélénium	0,01 mg L <sup>-1</sup>	<0,01 µg L <sup>-1</sup>
Zinc	3 mg L <sup>-1</sup>	0,01 µg L <sup>-1</sup>

Concernant la consommation humaine, des teneurs maximales dans les aliments ont été définies par la commission européenne (EC 466/2001) pour certains contaminants dont le plomb, le cadmium et le mercure (Tableau 5). De plus, l'OMS s'est penchée sur la qualité de

l'eau de boisson et a donné des recommandations quant aux concentrations en éléments traces à ne pas dépasser (Tableau 6).

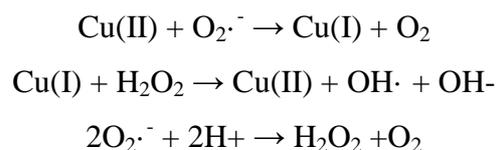
## II. Effets du stress métallique sur les organismes terrestres et réponses de ces organismes.

### 1. Les effets délétères des éléments en traces métalliques

Les ETM peuvent facilement être bioaccumulés dans les organismes, interférant dans les mécanismes physiologiques et cellulaires. En tant qu'analogues à d'autres éléments essentiels, les cations métalliques peuvent entrer en compétition lors de l'absorption des nutriments, pouvant induire des carences. En cas d'accumulation dans l'appareil végétatif des plantes, les ETM interfèrent aussi dans les fonctions essentielles que sont la photosynthèse ou les échanges gazeux, perturbant la bonne santé de la plante (phytotoxicité). La phytotoxicité des métaux se remarque par certains symptômes visuels tels qu'une inhibition de la croissance, la chlorose ou la nécrose des parties aériennes des plantes.

Lorsqu'ils entrent dans les cellules biologiques, les éléments métalliques bouleversent le fonctionnement intracellulaire. Les propriétés chimiques des métaux leur donnent une forte affinité pour les groupements thiols (-SH), retrouvés dans de nombreuses protéines dont les enzymes. En se fixant sur de telles molécules, les métaux (principalement Cd ou Hg) peuvent ainsi inactiver la fonction essentielle de ces enzymes (Chrestensen et al., 2000). De plus, beaucoup d'enzymes possèdent un noyau métallique qui peut être déplacé par d'autres métaux conduisant encore une fois à l'inhibition de l'activité enzymatique (Van Assche et Clijsters, 1986). Par ailleurs, les métaux, en particulier le cuivre, comme le fer, participent à bon nombre de réactions redox et à la formation, via les réactions de Fenton, d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Stohs et Bagchi, 1995) responsables de ce que l'on nomme « stress oxydatif ».

Réactions de Fenton :



Ces ERO ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}\cdot$ ) sont très dommageables aux cellules, elles entraînent la peroxydation des lipides, abîment l'ADN et altèrent l'homéostasie du calcium (Figure 1). Les

différentes propriétés des métaux entraînent donc des dégâts différents dans les cellules. La production d'ERO par la réaction de Fenton concerne plutôt le fer, le cuivre, le chrome ou encore le vanadium alors que les métaux tels que le mercure, le nickel, le plomb et surtout le cadmium entraînent une diminution du glutathion (GSH), molécule essentielle au système antioxydant (Schützendübel et Polle, 2002).

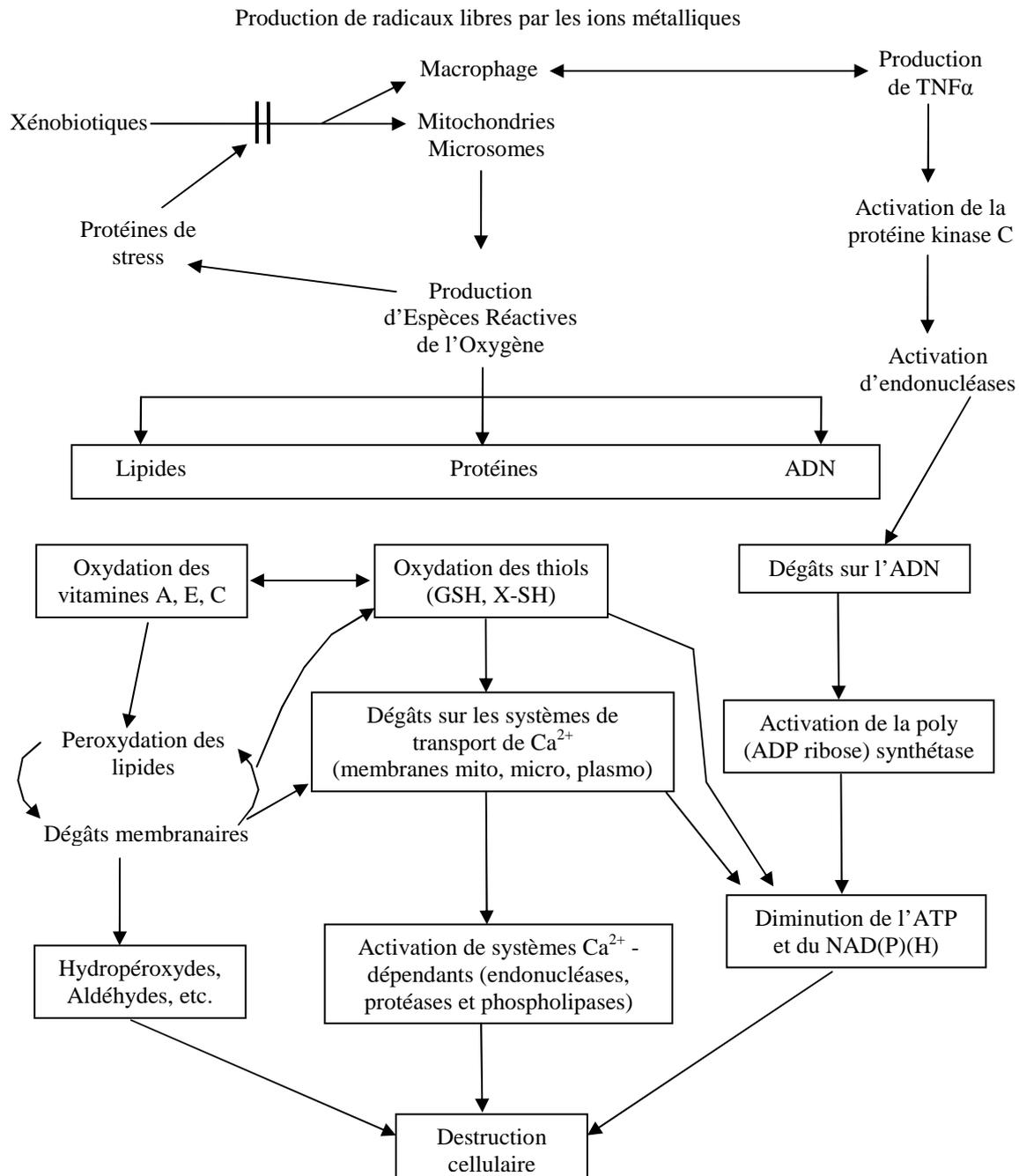


Figure 1 : Résumé des interactions connues mettant en jeu les espèces réactives de l'oxygène et leurs dégâts dans les tissus (traduit d'après Stohs et Bagchi, 1995).

Il est déjà bien établi que cette toxicité des ETM affecte aussi l'activité et la dynamique des communautés microbiennes du sol (Domsch, 1984 ; McGrath et al., 1995). Selon l'intensité de la contamination métallique dans les sols, les processus biologiques peuvent être fortement ralentis voir inhibés. Ainsi, la réduction de l'activité de certaines enzymes (phosphatase, uréase, par exemple) dans les sols contaminés en métaux (Kandeler et al., 2000 ; Wang et al., 2007) diminue la minéralisation du phosphore et de l'azote, influençant la fertilité du sol. Lorsque les teneurs en métaux augmentent, la respiration globale du sol (CO<sub>2</sub> dégagé) et la dégradation de la cellulose sont aussi diminuées, conduisant à l'accumulation des litières (Domsch, 1984). Une baisse de la biomasse bactérienne fixatrice d'azote à cause d'un stress métallique peut affecter le bon fonctionnement de la symbiose avec les légumineuses et donc la fixation de N<sub>2</sub>. La modification de ces fonctions microbiennes peut donc avoir un impact fort sur les écosystèmes dans la mesure où ce sont des processus contrôlant des étapes importantes des cycles biogéochimiques.

L'effet néfaste des ETM sur les microorganismes symbiotiques des plantes est, par ailleurs, préjudiciable à la bonne croissance des plantes. Outre les bactéries, les champignons mycorhiziens sont aussi sensibles aux pollutions métalliques (Leyval et al., 1997 ; Cairney et Meharg, 1999 ; Entry et al., 2002). Or, comme il sera développé plus loin, ces champignons symbiotiques, qui colonisent 90% des plantes terrestres, favorisent grandement la croissance des plantes. Même si les champignons mycorhiziens ont un fort potentiel d'adaptation et que des isolats tolérants aux métaux ont déjà été mis en évidence (Weissenhorn et al., 1993), une baisse de la diversité fongique peut réduire la biodiversité des plantes dans un écosystème terrestre (Van der Heijden et al., 1998). Selon les conditions du sol et selon les espèces mycorhiziennes étudiées, les ETM peuvent en effet avoir des effets toxiques sur les champignons (Gadd, 1993a) menant à une baisse de la densité de spores et du potentiel infectieux du champignon (Leyval et al., 1995).

## 2. Les mécanismes de réponse au stress métallique

En réponse à la toxicité des ETM, les organismes ont développé un certain nombre de mécanismes de protection. Pour réduire le stress métallique, les organismes peuvent limiter l'accumulation des métaux dans les cellules (exclusion), stocker l'élément toxique dans les vacuoles (chélation et séquestration) et/ou activer les systèmes antioxydants (protéines de réponse au stress). Ces mécanismes de défense se retrouvent chez tous les organismes et en particulier chez les plantes (Hall, 2002 ; Figure 2).

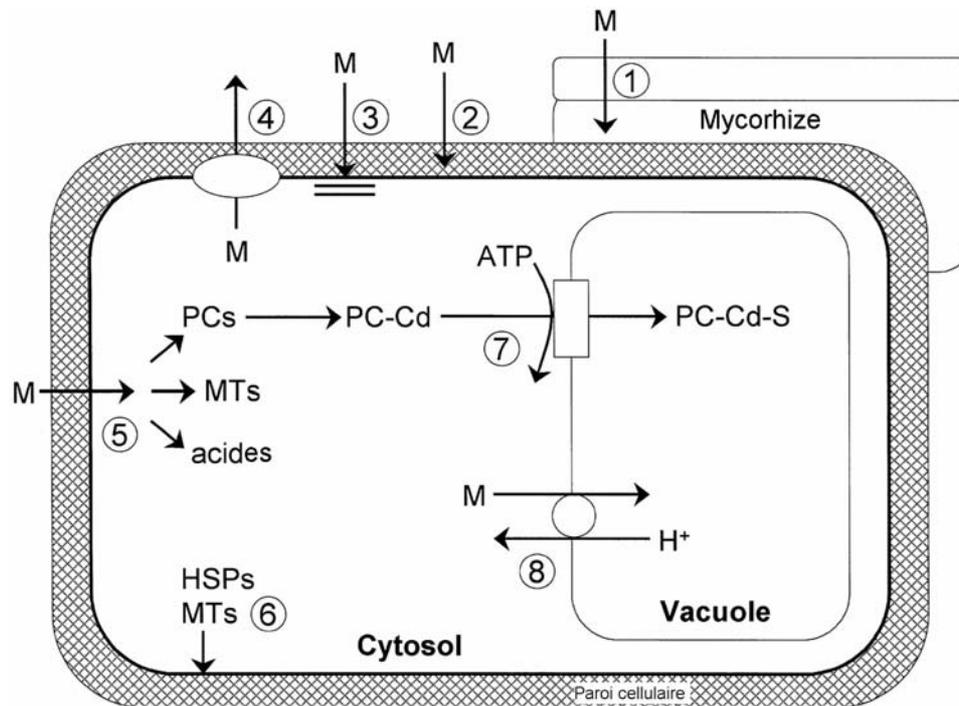


Figure 2 : Résumé des mécanismes cellulaires connus potentiellement impliqués dans la détoxification des métaux et la tolérance des plantes. 1. Immobilisation (extra- et intracellulaire) par les mycorhizes 2. Liaison avec la paroi cellulaire et les exsudats racinaires. 3. Réduction de l'influx à travers la membrane plasmique. 4. Efflux actif dans l'apoplaste. 5. Chélation dans le cytosol par différents ligands. 6. Réparation et protection de la membrane plasmique sous conditions de stress. 7. Transport du complexe PC-Cd dans la vacuole. 8. Transport et accumulation des métaux dans la vacuole. (d'après Hall, 2002). PCs = Phytochélatins, MTs = Metallothionéines, HSPs = Heat Shock Proteins.

Alors que l'efflux des ions toxiques concerne plutôt les bactéries (Nies, 2003), les plantes peuvent immobiliser les métaux dans la rhizosphère en exsudant des acides organiques, citrate et malate par exemple (Larsen et al., 1998) ou en favorisant le développement de certains microorganismes (mycorhization). Néanmoins, pour des métaux comme le mercure, l'arsenic ou le sélénium, les plantes sont capables de les évacuer par exsudation racinaire ou volatilisation. Mais le mécanisme de protection le plus utilisé chez les êtres vivants est la séquestration des ions métalliques pour détoxifier les cellules (Clemens, 2006). La chélation des métaux, une fois entrés dans le cytosol de la cellule, est effectuée par des peptides tels que les métallothionéines (MT) et les phytochélatines (PC) (Cobbet, 2000). La distinction entre ces deux protéines chélatantes est parfois sujette à discussion; les MTs ont d'abord été identifiées chez les mammifères et les PCs chez les plantes, mais des MTs ont

aussi été isolées chez les plantes et des gènes codants pour la PC synthase ont été trouvés chez des organismes autres que les plantes. Quoiqu'il en soit, chez les plantes, la formation de complexes protéiques métalliques (PC-M) à faible poids moléculaire (LMW) permet le transport, via des transporteurs localisés sur le tonoplaste (transporteurs ABC: Bovet et al., 2005), et le stockage des métaux dans les vacuoles sous forme de complexe à haut poids moléculaire (HMW). En réponse au stress oxydant, les cellules peuvent aussi synthétiser des protéines de réponse au stress telles que les « heat-shock proteins », des peroxydases, ou la superoxyde dismutase (SOD) pour lutter contre les ERO.

Face à la pression de sélection que constitue le stress métallique, les organismes les plus aptes génétiquement à développer ces systèmes de réponse à la toxicité sont plus résistants que les autres, c'est la notion de tolérance. Ainsi, des individus et des populations tolérants aux ETM ont souvent été identifiés, en particulier chez les plantes (Turner, 1994) et les microorganismes (Leyval et al., 1995). La distinction entre des individus tolérants et non-tolérants (sensibles) aux métaux est basée sur leurs performances de croissance (survie, biomasse, reproduction) sur des substrats contaminés (Baker et Walker, 1989). Des plantes résistantes s'installeront ainsi mieux dans un sol pollué, survivront mieux et produiront plus de biomasse que des plantes non-tolérantes. Par ailleurs, il existe une certaine plasticité de la tolérance, il semblerait en effet que la tolérance aux métaux puisse être perdue ou au contraire induite par acclimatation (Baker et Walker, 1989).

### **III. Cas du cadmium (Cd) : un élément particulièrement étudié.**

#### **1. Origine, utilisations et toxicité**

De tous les ETM, le cadmium est celui sur lequel s'est porté le plus d'attention, de par sa forte toxicité et sa facilité à être bioaccumulé dans les organismes. Présent naturellement dans la croûte terrestre à une concentration moyenne de  $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ , les plus faibles teneurs en Cd sont trouvées dans les sols issus des roches éruptives (moins de  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$  sol sec). Les sols issus des roches métamorphiques ont des concentrations comprises entre  $0,1$  et  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  alors que ceux dérivés des roches sédimentaires montrent les concentrations les plus élevées (jusqu'à  $11 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Baize, 1997). Or, les activités anthropiques contribuent depuis la moitié du 20<sup>ème</sup> siècle à augmenter les teneurs en Cd dans les sols, les principales sources de contamination des sols étant les pratiques agricoles (utilisation d'engrais phosphatés riches en Cd et épandages de déchets organiques) et les usines de production de métaux non-ferreux

(ex : raffinage du zinc et du plomb). De plus, le cadmium est un métal à usage industriel : il est utilisé pour la métallisation anticorrosion des surfaces (cadmiage), il entre dans la fabrication des accumulateurs électriques (batteries et piles), des pigments, des stabilisateurs de matières plastiques et des alliages (INERIS, 2005).

Aujourd'hui, ce métal est donc présent dans tout l'environnement et l'homme y est principalement exposé via l'alimentation. L'observation, dans les années 70, de la maladie itaï-itaï (Emmerson, 1970) chez des paysans japonais se nourrissant de riz cultivé dans des rizières irriguées par une eau fortement polluée en Cd a alerté l'opinion publique et fait que cet élément est particulièrement surveillé. Dans les écosystèmes terrestres, l'inhibition des micro-organismes du sol apparaît pour des concentrations en Cd variant entre 4 et 50 mg kg<sup>-1</sup>. Chez les végétaux, des inhibitions de croissance peuvent apparaître pour des concentrations variant de 1 à 5 mg kg<sup>-1</sup> (Bourelhier et Berthelin, 1998). En effet, l'exposition des plantes à de fortes doses de Cd entraîne une inhibition de la croissance et une chlorose des feuilles, liées à un dysfonctionnement de l'équilibre hydrique (perturbation de l'ouverture des stomates et interférences avec le transport d'éléments essentiels), de la machinerie photosynthétique et des enzymes du métabolisme (Das et al., 1997 ; Clemens, 2006). Chez l'homme, après ingestion, le cadmium est transporté dans le sang fixé à l'hémoglobine ou aux métallothionéines, et se concentre principalement dans le foie et les reins. Avec une demi-vie de 20 à 30 ans dans le rein, le métal s'accumule tout au long de la vie, il est stocké sous forme complexée à la métallothionéine. Une exposition chronique au cadmium entraîne l'apparition d'une néphropathie pouvant évoluer vers une insuffisance rénale. C'est lorsque la capacité de synthèse de métallothionéines ne suffit plus pour maintenir le cadmium sous forme liée que le cadmium non fixé peut exercer son action toxique avec une atteinte fonctionnelle tubulaire rénale et des interférences avec le métabolisme du calcium qui induit des problèmes osseux (ostéoporose, ostéomalacie). En cas d'inhalation (les fumeurs sont les personnes les plus exposées), le cadmium se dépose le long du tractus respiratoire et amène à des troubles respiratoires (INERIS, 2005).

## 2. Comportement dans les sols

Les conséquences écologiques d'une pollution métallique sont fortement dépendantes de la solubilité et de la mobilité du métal dans le profil de sol. La forme ionique libre du cadmium Cd<sup>2+</sup> (sous forme hydratée [Cd(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>2+</sup>) est souvent considérée comme sa forme la plus biodisponible, c'est-à-dire la plus apte à être prélevée par les organismes vivants et à agir

sur leur métabolisme. En effet, d'après Prokop et al. (2003), la concentration en Cd libre dans des échantillons de sol est bien corrélée à sa fraction extractible au DTPA, un extractant chimique complexant souvent utilisé pour évaluer la disponibilité des métaux en traces pour les plantes, et aux résultats de tests écotoxicologiques qui traduisent l'effet de la fraction biodisponible de Cd. Concernant la spéciation de Cd en solution, les modèles (GEOCHEM par exemple), basés sur des calculs géochimiques, indiquent souvent la forme ionique  $\text{Cd}^{2+}$  comme étant quantitativement majoritaire, mais il a été montré que la complexation de Cd avec des ligands organiques tient aussi une part importante (Krishnamurti et Naidu, 2003). Selon les autres éléments présents en solution, Cd peut aussi former des complexes inorganiques variés tels que des complexes chlorés ( $\text{CdCl}^+$ ,  $\text{CdCl}_2$ ), sulfatés ( $\text{CdSO}_4$ ), carbonatés ( $\text{CdHCO}_3^+$ ) ou hydroxylés ( $\text{CdOH}^+$ ).

Comparé à d'autres métaux, Cd est relativement mobile dans les sols. Sterckeman et al. (2000) ont comparé les distributions verticales de Cd, Pb et Zn dans 12 profils de sol et la mobilité de ces métaux a été classée dans l'ordre suivant :  $\text{Cd} \gg \text{Pb} \geq \text{Zn}$ , les plus fortes concentrations en métaux étant observées dans les horizons de surface (premiers 20-30 cm). Un fractionnement de Cd par des extractions séquentielles sur des sols contaminés de 3h à 8 semaines après la contamination a par ailleurs montré que le Cd reste majoritairement sous forme échangeable au cours du temps et que son immobilisation sur la phase solide est plus lente que celle des autres métaux (Lu et al., 2005). Des résultats similaires ont été observés sur des sols calcaires iraniens (Jalali et Khanlari, 2008). La distribution de Cd dans les sols, comme pour la plupart des métaux, est influencée principalement par le pH (Anderson and Christensen, 1988). Le pH influence l'adsorption du métal, mécanisme principal de fixation du Cd dans les sols et défini comme une accumulation de matière à l'interface entre la surface solide du sol et la solution aqueuse, également influencée par la texture du sol (Figure 3). La capacité de sorption du sol est approximativement multipliée par trois lorsque le pH augmente d'une unité (Bradl, 2004).

L'adsorption du Cd sur la phase solide est principalement régie par des forces de liaisons électrostatiques de type Van der Waals et dépend de la présence de constituants du sol chargés négativement. Ainsi, Cd est facilement adsorbé sur les phyllosilicates et les matières organiques qui présentent une charge négative variable (dépendante du pH). Cd peut aussi être adsorbé plus fortement par complexation de surface (formation de complexes de sphère interne S-O-M) sur les oxydes de Fe, Al et Mn, même si l'affinité du Cd pour les oxydes est plus faible que celle d'autres ions métalliques (McBride, 1989). De plus, Cd entre en compétition avec les autres métaux (Pb, Cu, Zn en particulier) pour la sorption sur les surfaces

solides du sol (Echeverria et al., 1998). Par exemple, la présence simultanée de Cd et de Pb dans des sols peut diminuer la sorption du Cd sur les minéraux (Serrano et al., 2005). Enfin, la précipitation est un autre mécanisme qui peut contribuer à l'immobilisation du Cd dans les sols. Dans des conditions de pH alcalin, de faible CEC, de faible teneur en matière organique et en présence de  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  peut ainsi précipiter sous forme de carbonate de cadmium ( $\text{CdCO}_3$ ) réduisant sa solubilité (Bradl, 2004).

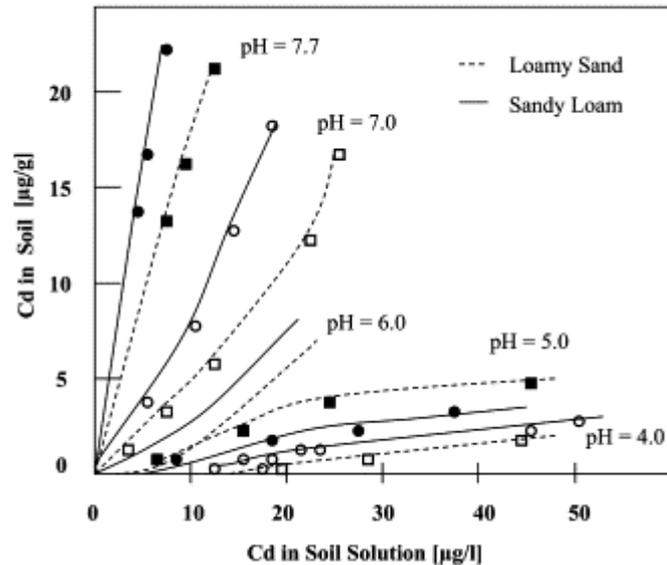


Figure 3 : Isothermes d'adsorption du cadmium dans deux sols de textures différentes et à différents pH (Bradl, 2004).

### 3. Phytodisponibilité

#### a. Le transfert sol-plante de Cd

La phytodisponibilité du cadmium, qui peut être définie comme la quantité de métal pouvant être transférée à la plante durant son développement (Bourrelier et Berthelin, 1998), a déjà fait l'objet de nombreuses études du fait d'un transfert sol-plante relativement facile et de l'importance de connaître les teneurs en Cd dans les parties aériennes des végétaux. Le transfert de Cd aux plantes est dépendant d'un côté du facteur plante, c'est-à-dire de la capacité de la plante à absorber, accumuler et tolérer le Cd dans ses tissus, et d'un autre côté du facteur sol qui conditionne la mobilité de Cd.

Il existe différentes stratégies de réponse des plantes à l'absorption des métaux, menant à des gammes de concentrations différentes dans les tissus végétaux (Yang et al., 2008). On

distingue quatre groupes de plantes en fonction de la teneur en ETM dans la plante rapportée à la teneur dans le sol (Figure 4) : les plantes « excluantes » qui maintiennent une concentration faible et constante dans les parties aériennes jusqu'à une valeur critique, les plantes « indicatrices » qui régulent le prélèvement des métaux reflétant ainsi la concentration dans les sols, les plantes « accumulatrices » capables de concentrer les métaux dans leurs tissus et les plantes « hyperaccumulatrices » qui ont la capacité de tolérer des concentrations en métaux très élevées (par exemple : *Thlaspi caerulescens* dont les teneurs en Cd sont supérieures à 0,2% dans les feuilles) (Gérard et al., 2000). Ainsi des espèces végétales cultivées sur un même sol prélèvent plus de cadmium que d'autres, généralement dans l'ordre suivant : plantes à feuilles > légumes racines > céréales.

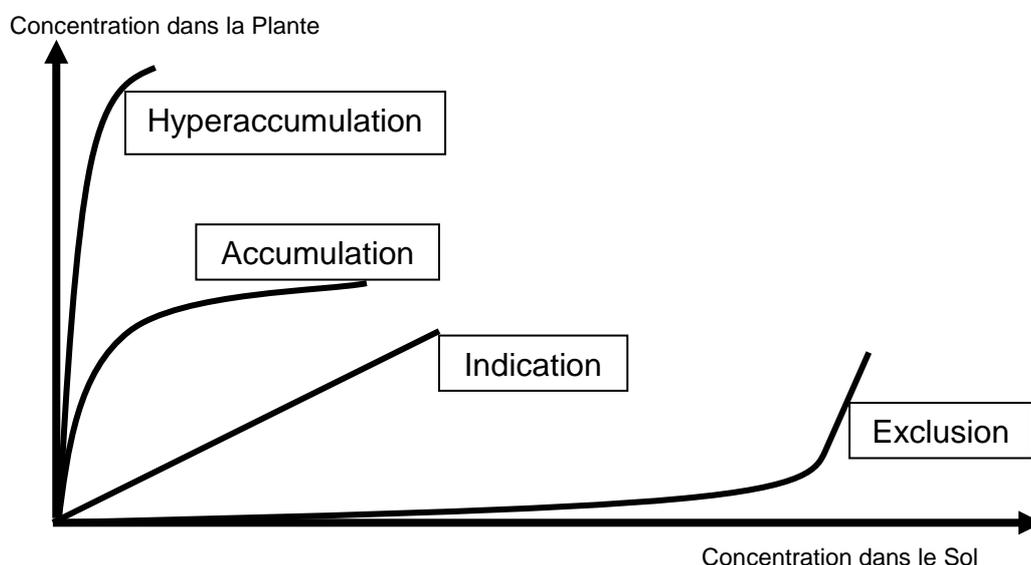


Figure 4 : Les différentes réponses des plantes à l'accroissement de la concentration des éléments en traces dans le sol (Bourrelrier et Berthelin, 1998).

L'entrée du cadmium en solution dans les plantes est conditionnée par le flux de transpiration de la plante (Salt et al., 1995 ; Van der Vliet et al., 2007) qui induit un transfert d'eau du sol aux racines jusqu'aux parties aériennes. Ce flux convectif ou « mass flow » est l'un des deux processus impliqués dans le transport des éléments en solution vers la racine, mais pour les éléments présents en faible quantité comme c'est le cas du Cd, l'autre processus qu'est le flux de diffusion tient aussi une place importante (Cutler et Rains, 1974). En effet, la diminution de la concentration en solution à proximité de la racine, induite par le prélèvement racinaire, pourrait générer un gradient de concentration entre le sol et la racine et ainsi créer un flux de diffusion. Ces deux types de flux doivent ainsi être pris en compte dans

l'élaboration de modèles mécanistiques du transfert de cadmium à la plante (Sterckeman et al., 2004 ; Verma et al., 2007). L'absorption du Cd a souvent été caractérisée lors d'études en hydroponie et la cinétique d'absorption du Cd en fonction de sa concentration en solution est classiquement décomposée en deux phases (Hart et al., 1998 ; Figure 5) : une composante saturante à faible concentration de  $\text{Cd}^{2+}$  et une composante linéaire à plus forte concentration. Il semble bien établi que la composante saturante reflète un influx du Cd par transporteur à travers la membrane plasmique des cellules racinaires alors que la composante linéaire a souvent été associée à une sorption apoplastique (Hart et al., 1998) même s'il a été récemment suggéré que ce transport non-saturant a principalement lieu par voie symplastique (Van der Vliet et al., 2007 ; Perriguet et al., 2008).

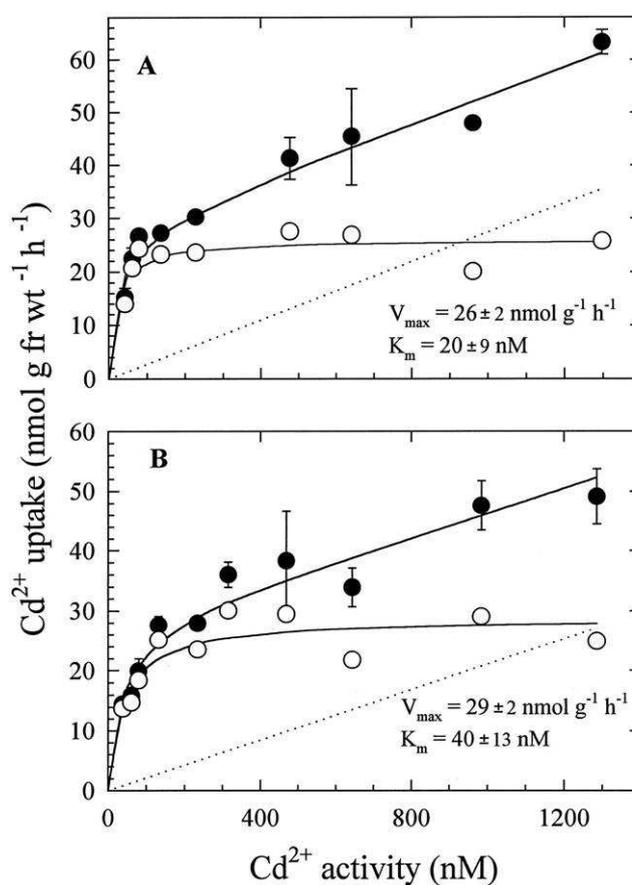


Figure 5 : Absorption de  $\text{Cd}^{2+}$  en fonction de sa concentration en solution par des racines de plantules de blé tendre (A) et de blé dur (B). Les composantes linéaire (ligne pointillée) et saturante ( $\circ$ ) ont été obtenues à partir des données expérimentales ( $\bullet$ ) par soustraction de la régression linéaire établie pour les points de fortes concentrations en  $\text{Cd}^{2+}$  (Hart et al., 1998).

Outre la capacité de la plante à accumuler les métaux, la phytodisponibilité de Cd dépend aussi grandement des conditions édaphiques et rhizosphériques. Comme décrit précédemment la mobilité de Cd est dépendante des paramètres du sol et la quantité de Cd prélevée par les plantes peut souvent être reliée à ces paramètres. Ainsi, le transfert de Cd à la plante dépend principalement du pH et de la concentration du métal dans le sol (Tudoreanu et Phillips, 2004), de la présence/absence d'autres cations, du Zn en particulier (Abdel-Sabour et al., 1988 ; Nan et al., 2002), de la quantité de carbone organique dissout : le Cd peut en effet être phytoaccumulé sous forme de complexe Cd - acide organique à faible poids moléculaire (Cieslinski et al., 1998). En plus de ces différents facteurs, la phytodisponibilité peut être modifiée lors de l'ajout d'amendements variés (Kirkham, 2006).

#### b. Mécanismes moléculaires d'absorption de Cd par les plantes

L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'entrée du Cd dans les cellules a permis de mettre en évidence l'existence de différents types de transporteurs (Figure 6). Même si Lombi et al. (2001) ont montré l'expression de transporteurs membranaires à forte affinité pour le cadmium chez *Thlaspi caerulescens*, les voies d'entrées du Cd dans les cellules semblent être plutôt majoritairement non spécifiques via différents transporteurs ubiquitaires de cations essentiels ( $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) (Clemens, 2006). Les techniques de biologie moléculaire et de génétique ont permis d'identifier des gènes codant pour différentes familles de transporteurs : les ATPases (HMAs), les transporteurs ABC (ATP-binding cassette), les protéines Nramps (Natural resistance associated macrophage proteins), la famille des CDF (Cation diffusion facilitator), les transporteurs ZIP (ZRT,IRT-like proteins), les antiports cation/ $H^+$  et autres canaux cationiques (Hall et Williams, 2003). Les ATPases de type P forment une superfamille de transporteurs trouvés chez la majorité des êtres vivants et qui jouent le rôle de pompes sur les membranes cellulaires, grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP, pour bon nombre de cations dont les métaux lourds et  $Cd^{2+}$  (Axelson et Palmgren, 2001). Les transporteurs ABC constituent une autre famille large et diversifiée de transporteurs, ils seraient entre autres impliqués dans le transport vers la vacuole du Cd complexé aux phytochélatines (Bovet et al., 2005). Les protéines membranaires Nramps ont été décrites pour la première fois dans des macrophages chez la souris puis elles ont été identifiées chez les plantes (Williams et al., 2000) Il a été montré que des protéines Nramps jouent le rôle de transporteurs de métaux essentiels ( $Fe^{2+}$  et  $Mn^{2+}$ ) mais aussi de Cd, ce transport étant même exacerbé en cas de carence en fer (Thomine et al., 2003). Les

transporteurs CDF, identifiés comme des transporteurs du zinc, du cobalt et du cadmium, semblent jouer un rôle plutôt dans la régulation (homéostasie) que le transport/prélèvement des métaux. Ils seraient en effet impliqués dans la séquestration vacuolaire et l'efflux des métaux (Haney et al., 2005). Salt et Wagner (1993) ont aussi mis en évidence un transport de Cd vers les vacuoles via un antiport  $Cd^{2+}/H^{+}$  présent sur le tonoplaste. Enfin, les transporteurs ZIP semblent être une voie privilégiée d'entrée du Cd dans les cellules. Ces transporteurs ont d'abord été identifiés comme transporteurs majeurs du fer (les IRT) et du zinc (les ZRT) mais ils sont aussi capables de transporter avec une forte affinité le cadmium et le manganèse (Guerinot 2000), en particulier en cas de carence en fer (Cohen et al., 1998). Une fois entrée dans les cellules racinaires, s'il n'est pas accumulé dans les vacuoles ou sur les parois membranaires, une partie du Cd peut être transférée aux parties aériennes de la plante via le xylème. Le Cd serait acheminé dans le xylème depuis les cellules racinaires sous forme de complexes à faible poids moléculaires (LMW) (Clemens et al., 2002), vraisemblablement des complexes Cd-Phytochélatine, jusqu'aux feuilles (Wojcik et Tukiendorf, 2005).

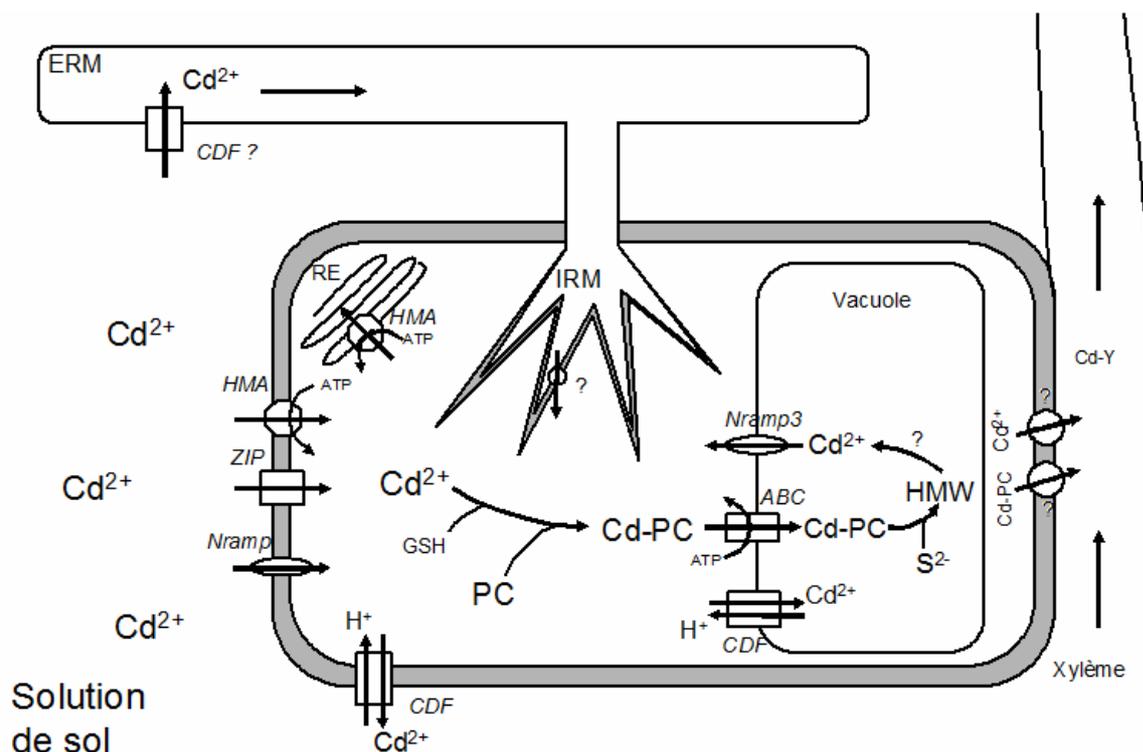


Figure 6 : Mécanismes de transport du Cd dans les cellules racinaires. HMA : Heavy-Metals ATPases; ZIP : Zinc-Iron like Proteins; Nramp : Natural resistance associated macrophage proteins; CDF : Cation Diffusion Factor; Cd-PC : complexe Cd-phytochélatine; HMW : complexe à haut poids moléculaire; ERM : mycélium fongique extraracinaire; IRM : mycélium fongique intracellulaire (arbuscules).

c. Estimation de la phytodisponibilité du Cd

Dans une optique de gestion des risques, il est absolument nécessaire de déterminer la phytodisponibilité du Cd dans les sols. La concentration totale en Cd dans le sol ne reflète pas bien la concentration dans la plante. Or, la complexité du système sol-plante fait que les méthodes existantes pour mesurer la disponibilité du Cd restent approximatives. Des termes plus nuancés tels que « fraction potentiellement disponible », « fraction véritablement disponible » ou « fraction accessible » sont ainsi employés pour parler de la disponibilité des métaux (Peijnenburg et Jager, 2003). Les techniques développées pour évaluer la phytodisponibilité du Cd sont : les extractions chimiques, les méthodes de dilution isotopique, la mesure de l'activité de l'ion libre dans la solution de sol (mesure électrochimique, dialyse) et la mesure par DGT (gradient diffusif sur film fin) de la concentration efficace en métal (Nolan et al., 2005). Un grand nombre de méthodes d'extraction ont déjà été suggérées, allant de l'utilisation d'acides à celle d'agents chélatants en passant par diverses solutions salines tamponnées ou non (Kabata-Pendias, 2004). Les extractions avec des sels neutres ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ...) seraient celles qui reflètent le mieux les concentrations mesurées dans les plantes alors que les réactifs complexants, largement utilisés (DTPA, EDTA), les surestiment (Menzies et al., 2007). Le marquage de sol au  $^{109}\text{Cd}$  et la détermination des pools de Cd labile (valeur E) et accessible à la plante (valeur L) par dilution isotopique (Smolders et al., 1990 ; Stanhope et al., 2000) est une autre technique, plus lourde à mettre en place, qui reflète très bien la fraction phytodisponible de Cd. La taille du pool de Cd phytodisponible dans un sol est par ailleurs le mieux évalué par le pool isotopiquement échangeable mesuré par la technique de cinétique d'échange isotopique (Gérard et al., 2000) qui permet de rendre compte de la capacité tampon du sol (Gray et al., 2004). D'autre part, la mesure de la concentration en Cd libre en solution donne aussi une indication sur la quantité de Cd du sol potentiellement disponible pour la plante, même si il est incertain que seule cette forme libre soit prélevée par les plantes. L'activité de  $\text{Cd}^{2+}$  peut être mesurée de manière électrochimique grâce à des électrodes, méthode facile d'usage et utile dans des études environnementales même si des problèmes d'interférence avec d'autres ions peuvent parfois perturber la reproductibilité de la mesure (Piñeros et al., 1998 ; Plaza et al., 2005).  $\text{Cd}^{2+}$  peut aussi être dosé par absorption atomique après dialyse de Donnan (Salam et Helmke, 1998), la sélectivité de la membrane utilisée dans cette méthode, faite pour ne laisser passer que des cations, ne permet cependant pas de prendre en compte les complexes organiques présents en solution. Enfin, la mesure *in situ* du Cd biodisponible peut être réalisée par la technique du gradient

diffusif sur film fin (DGT : Diffusive Gradients in Thin films) développée par Zhang et al. (1995). Cette technique basée sur l'utilisation d'une résine chélatante et séparée de la surface du sol par un gel perméable de porosité connue, permet de quantifier (concentration efficace  $C_E$ ) les ions métalliques accumulés par diffusion dans la résine. Le gel diffusif utilisé permet le passage des ions libres, des complexes inorganiques mais aussi des complexes organiques, ce qui donne une bonne relation de  $C_E$  avec la concentration mesurée dans la plante, même si cela reste fortement dépendant des conditions environnementales et nécessite d'être optimisé (Cornu et Denaix, 2006).

Les microorganismes exercent aussi une influence non négligeable sur la phytodisponibilité des ETM car ils affectent la croissance et la morphologie des racines, la physiologie et le développement de la plante, le fractionnement des métaux et leur prélèvement par la racine (Tao et al., 2005), les champignons mycorhiziens jouent en particulier un rôle important (Leyval et Joner, 2001).

#### **IV. Les champignons mycorhiziens à arbuscules (MA).**

##### 1. Taxonomie des champignons mycorhiziens

Les associations mycorhiziennes, entre les racines des plantes et les champignons, sont très fréquemment rencontrées dans presque tous les écosystèmes naturels. Environ 90% des plantes terrestres sont en effet capables de former des mycorhizes. Ces associations racine-champignon forment une symbiose qui joue un rôle essentiel dans l'absorption des éléments minéraux dans les écosystèmes terrestres. Les deux partenaires s'échangent mutuellement des éléments nécessaires à leur bon développement : les champignons (hétérotrophes) fournissent des éléments minéraux à la plante (autotrophe), en échange de molécules carbonées issues de la photosynthèse. Cette colonisation des plantes par les champignons est une association très ancienne (Selosse et Le Tacon, 1998) et les quelques familles de plantes (*Chenopodiaceae*, *Caryophyllaceae*, *Brassicaceae*, *Urticaceae*) ne formant pas de mycorhizes font figures d'exceptions.

On distingue trois grands types de mycorhizes, basés principalement sur leur morphologie et le type de plante hôte associé : les ectomycorhizes, les ectendomycorhizes et les endomycorhizes (Harley et Harley, 1987) (Figure 7).

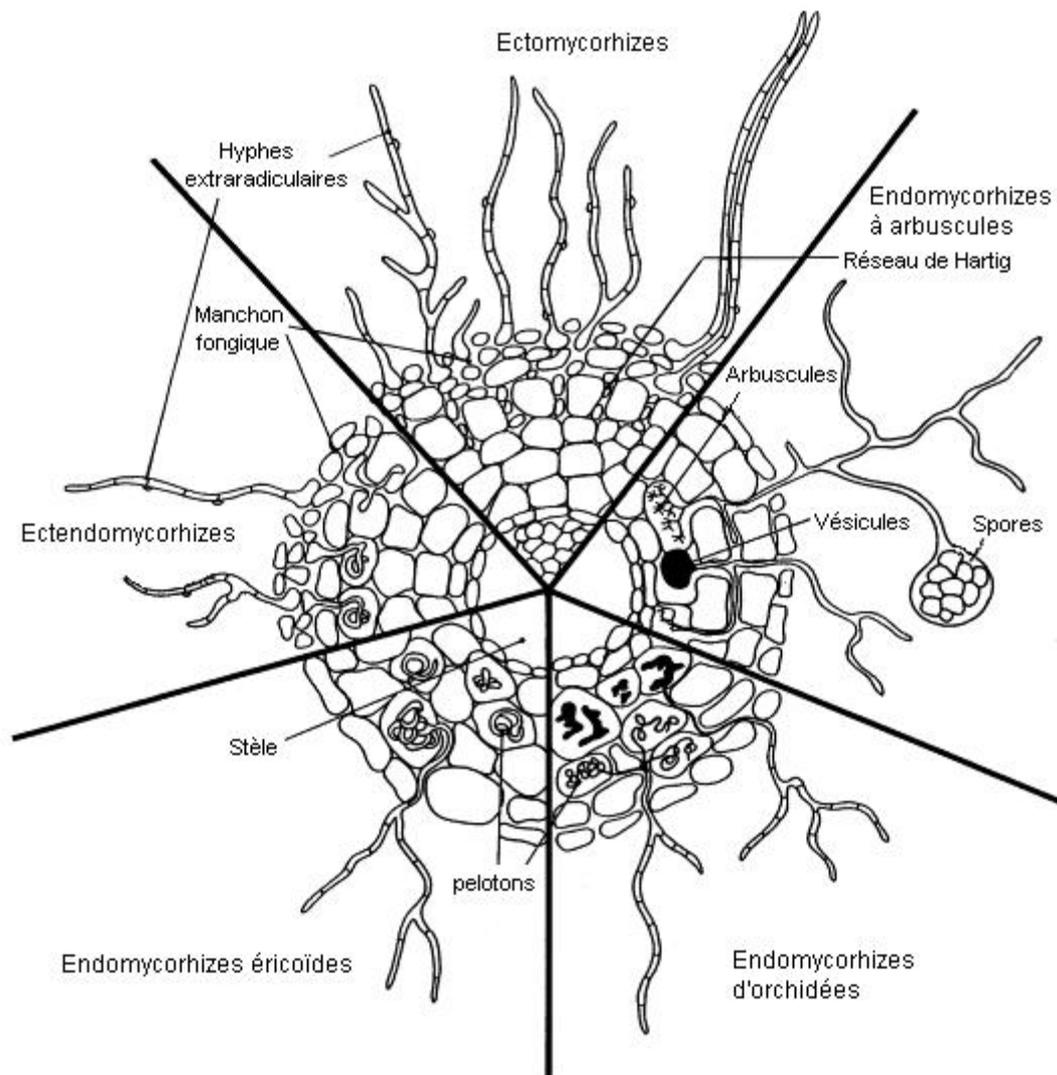


Figure 7 : Les différents types d'associations mycorhiziennes (d'après Selosse et Le Tacon, 1998).

- les ectomycorhizes (ECM) : ce sont des symbioses formées par des champignons colonisant principalement les arbres et arbustes (en majorité *Pinaceae*, *Betulaceae*, *Fagaceae*, *Salicaceae*, *Myrtiaceae*) des régions boréales, tempérées et montagneuses, qui produisent souvent des carpophores à la surface des sols forestiers. Ce sont majoritairement des Ascomycètes (truffes, terfez) et des Basidiomycètes (amanites, chanterelles, cortinaires...). Ils se développent de manière intercellulaire, en effet le mycélium progresse entre les cellules du cortex racinaire mais ne pénètre pas dans les cellules vivantes. Les ectomycorhizes se

caractérisent par la formation de tissus spécialisés. Outre les hyphes extramatriciels se propageant dans le milieu extérieur et assurant le rôle d'exploration et d'absorption, on distingue les hyphes agglomérés autour de la racine, formant un manchon fongique pseudoparenchymateux ou manteau gainant, et les hyphes qui s'insinuent entre les cellules du cortex formant un réseau appelé réseau de Hartig. C'est au niveau de ce réseau que se font les échanges d'éléments nutritifs entre le champignon et la plante.

- les ectendomycorhizes : comme les ECM, les champignons ectendomycorhiziens forment un manchon fongique autour des racines et un réseau de Hartig intercellulaire mais en plus les hyphes pénètrent à l'intérieur des cellules. Ces hyphes intracellulaires sont soit sous formes de pelotons (mycorhizes arbutoïdes) soit sous formes d'hyphes très courts (mycorhizes monotropoïdes). Ces types de mycorhizes sont restreints à des genres de végétaux particuliers : les ectendomycorhizes arbutoïdes se trouvent chez les genres *Arbutus* et *Arctostaphylos* de la famille des Éricacées et les ectendomycorhizes monotropoïdes colonisent les plantes non-chlorophylliennes des *Monotropaceae*. Ces champignons ectendomycorhiziens sont des basidiomycètes.

- les endomycorhizes : ce sont des champignons ne formant pas de manchon fongique mais dont les hyphes pénètrent dans les cellules du cortex racinaire. On distingue les endomycorhizes éricoïdes et les endomycorhizes d'orchidées, qui forment des pelotons d'hyphes intracellulaires, et les endomycorhizes à arbuscules qui colonisent l'intérieur des cellules sous forme d'arbuscules.

Les champignons endomycorhiziens éricoïdes sont des ascomycètes du genre *Hymenoscyphus* qui colonisent spécifiquement des plantes de la famille des Éricacées (des genres comme *Calluna*, *Erica*, *Vaccinium*, *Rhododendron*).

Les champignons endomycorhiziens d'orchidées sont les partenaires indispensables des *Orchidaceae* qui sont toutes, à un stade de leur vie, dépendantes d'une source externe de carbone. Les graines et embryons de cette famille de plantes ont très peu de réserves et, dès leur germination, la colonisation par le champignon leur est nécessaire pour se développer. L'endomycorhize fournit à l'orchidée les molécules carbonées et les nutriments indispensables à la plante, les espèces non-chlorophylliennes sont ainsi dépendantes de leur symbionte pendant toute leur vie. Dans ce type de champignons endomycorhiziens, on trouve les espèces *Rhizoctonia*, *Sebacina*, *Tulasnella* et *Russula* (ce sont des Basidiomycètes).

Enfin, nous nous intéressons plus particulièrement aux champignons (endo)mycorhiziens à arbuscules (MA) qui constituent le type de mycorhizes le plus répandu et le plus ancien, qui auraient coévolué avec les plantes terrestres depuis au moins 460 millions d'années (Redecker et al., 2000) et qui sont maintenant incapables de survivre sans plante hôte (ce sont des symbiotes obligatoires). Contrairement aux autres types de mycorhizes, ce sont des champignons aseptés faisant partie de l'ordre des Glomales (anciennement classé dans les Zygomycètes, il a été placé récemment dans un nouveau phylum : les Glomeromycètes (Schüßler et al., 2001)). Ils sont capables de coloniser une large variété de plantes, de la majorité des herbacées à quelques espèces ligneuses (ex : Peuplier, Eucalyptus). Les hyphes des champignons MA se développent dans le cortex racinaire où ils forment des arbuscules intracellulaires et des vésicules. Les arbuscules sont le lieu de contact et d'échanges d'éléments entre les deux partenaires et les vésicules constitueraient des organes de stockage. Des hyphes extraradiculaires se développent aussi sur plusieurs centimètres à l'extérieur de la racine, explorant le sol alentour, et pouvant porter une multitude de spores. Ces spores constituent l'organe de reproduction et de dissémination typique des champignons MA, elles peuvent contenir des centaines de noyaux qui ne possèdent pas forcément le même matériel génétique. La génétique des Glomeromycètes est néanmoins très mal connue et, même si le débat reste encore ouvert, ils sont supposés être asexués (Pawlowska et Taylor, 2004 ; Rosendhal, 2008). La diversité de structure et de forme des spores, isolées, sous formes de grappes ou dans des sporocarpes, a souvent été la base de la classification des champignons MA qui a été quelque peu remise en question ces dernières années. Récemment une nouvelle taxonomie basée sur l'analyse de la sous-unité 18S de l'ADNr a permis de construire l'arbre phylogénétique des Glomeromycètes (*Glomeromycota*) qui nécessite encore d'être amélioré (Schwarzott et al., 2001) (Figure 8).

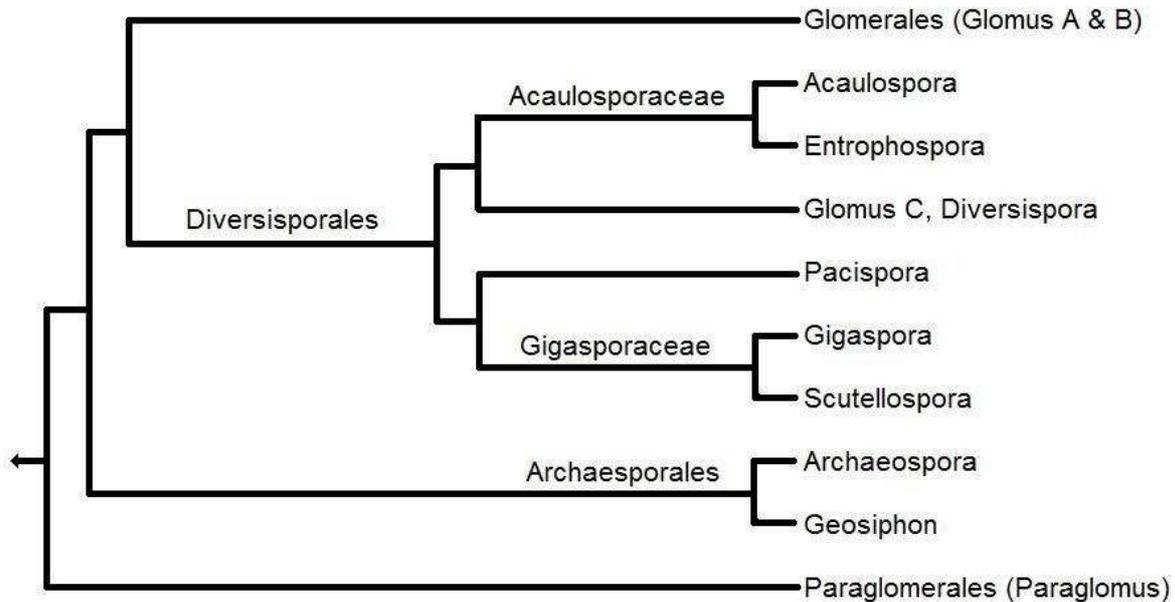


Figure 8 : Arbre phylogénétique des Glomeromycota basé sur l'analyse des séquences de la petite sous-unité ribosomale (dessiné d'après les définitions de Schwarzott et al., 2001).

## 2. Fonctionnement de la symbiose mycorhizienne arbusculaire

La symbiose mycorhizienne arbusculaire (MA) joue un rôle important dans le cycle des nutriments dans les écosystèmes terrestres. Néanmoins, la nature souterraine et une partie de la biomasse fongique étant incluse à l'intérieur des racines font que certains aspects du fonctionnement de cette symbiose restent encore inconnus même si de gros progrès dans la compréhension de ces mécanismes ont été faits avec le développement des techniques de biologie moléculaire et d'analyses génétiques. L'établissement de la symbiose MA commence par la colonisation d'une racine compatible par les hyphes produites par les propagules de champignons MA (spores asexuées ou racines déjà mycorhizées). Si l'hyphe ne rencontre pas de racine après 2 à 4 semaines de croissance le champignon ne peut pas se développer et compléter son cycle de vie. Dans ce cas, les spores peuvent se remettre en dormance après rétractation du protoplasme et réallocation des ressources en attendant de meilleures conditions (Logi et al., 1998). Suite à ce stade asymbiotique du champignon, le premier stade de la colonisation mycorhizienne est la formation d'un appressorium à la surface de la racine à partir duquel le champignon peut pénétrer dans l'épiderme et le cortex racinaire pour former les structures intracellulaires spécialisées que sont les pelotons et les arbuscules (Requena et al, 2007).

Lors du stade pré-symbiotique, c'est un dialogue chimique entre le champignon et la racine compatible qui permet la rencontre des deux partenaires. Des exsudats racinaires (« branching factor ») de la plante hôte induisent la germination des spores, la croissance et la ramification de l'hyphe (Buée et al., 2000), ce qui augmente les chances du champignon d'entrer en contact avec une racine. Ce composé induisant la ramification de l'hyphe a été isolé et identifié par Akiyama et al. (2005) comme étant une strigolactone, mais ce n'est pas le seul composé induisant cette réaction, les flavonoïdes peuvent aussi avoir des effets sur la croissance du champignon même si cet effet est variable selon le couple plante-champignon (Scervino et al., 2005). Par contre, ces signaux chimiques ne semblent pas concerner la formation des appressoria qui serait plutôt liée à un signal thigmotropique (induit par le contact). En effet, la seule présence physique de cellules épidermiques suffit à la formation d'appressoria (Nagahashi et Douds, 1997). La perception de ces signaux chimiques et physiques par le champignon laisse supposer l'existence de récepteurs sur la membrane plasmique du champignon pour la transmission du signal et dont  $Ca^{2+}$  pourrait jouer le rôle de 2<sup>nd</sup> messenger (Requena et al., 2007). Par ailleurs, Kosuta et al. (2003) ont montré que le champignon aussi émet une molécule signal qui active un gène de réponse à la symbiose (ENOD11) chez la plante hôte. Dans cette communication complexe entre le champignon MA et la plante, il faut aussi citer les phytohormones (cytokinines, gibberellines, éthylène, acide abscissique, auxines et acide jasmonique), dont les concentrations dans les plantes peuvent varier selon la présence ou non du champignon, mais dont les fonctions ne sont pas toujours bien connues (Hause et al., 2006).

L'utilisation de mutants de plantes résistants ou non à la mycorhization a permis de mettre en évidence des gènes spécifiques à la symbiose, contrôlant souvent à la fois la mycorhization et la nodulation (Gianinazzi-Pearson, 1996). A l'aide de ces mutants, il a été montré que la morphogénèse de la colonisation mycorhizienne, et donc la progression du champignon dans la racine, est strictement contrôlée par le génome de la plante hôte (Bonfante et Perotto, 1995). Après la formation de l'appressorium, une ouverture de l'épiderme de la racine, régulée par le gène LjSYM15, permet le passage de l'hyphe qui peut alors progresser à travers les cellules du cortex externe (régulé par les gènes LjSYM4 et LjSYMK) (Parniske, 2004). Après ce passage intracellulaire dans les couches superficielles du cortex, le champignon sort des cellules et passe par l'apoplaste au niveau du cortex interne et peut proliférer le long de l'axe longitudinal de la racine. L'hyphe forme alors des embranchements qui pénètrent dans les cellules du cortex interne et forment des arbuscules, sous le contrôle des gènes LjSYM15 et PsSYM36 (Parniske, 2004 ; Figure 9). La formation

des arbuscules dans les cellules corticales entraîne plusieurs modifications de l'organisation de la cellule hôte telles qu'une fragmentation de la vacuole, la disparition des amyloplastes, l'augmentation du nombre d'appareils de Golgi, l'augmentation de la taille et le déplacement en position centrale du noyau, et surtout l'invagination de la cellule. En effet, lorsque le champignon MA se développe dans la cellule corticale, le plasmalemme de la cellule s'invagine autour de l'arbuscule mais le champignon ne pénètre pas directement dans la cellule (Bonfante et Perotto, 1995). Ainsi, l'interface champignon – cellule racinaire est toujours composée des membranes des deux partenaires et il en résulte entre les deux un espace périarbusculaire où les éléments échangés peuvent être transférés ou accumulés.

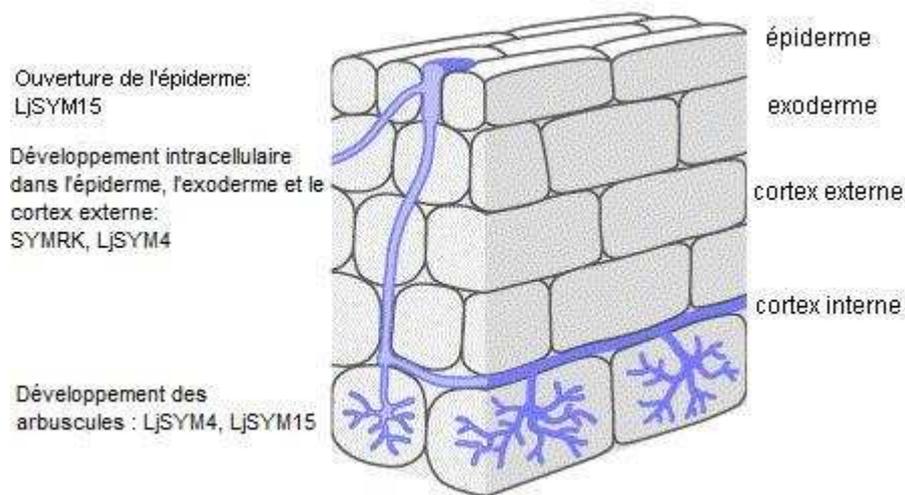


Figure 9 : Vue schématique du développement d'un champignon à travers les différentes couches cellulaires d'une racine et gènes de la plante impliqués dans la régulation des différentes étapes de la colonisation (d'après Parniske, 2004).

Les structures intracellulaires que sont les arbuscules constituent le lieu d'échanges de nutriments entre la plante et le champignon. Au niveau de ces structures bien ramifiées, le champignon reçoit des produits carbonés issus de la photosynthèse (sucres et lipides) lui permettant de croître et de former du mycélium à l'extérieur des racines (extraradiculaire) à la recherche d'éléments nutritifs (phosphore, azote) qu'il transporte jusqu'à la plante (Figure 10). Le cycle du champignon est complété lorsqu'il forme de nouvelles spores dans ce mycélium externe. L'échange et le transport des nutriments mettent en jeu un certain nombre de transporteurs membranaires. Le transport des phosphates par des plantes mycorhizées a ainsi particulièrement été étudié (Requena, 2005 ; Javot et al., 2007) et un certain nombre de transporteurs de phosphate ont pu être identifiés sur la membrane périarbusculaire (Harrison

et al., 2002 ; Poulsen et al., 2005) ainsi que sur le mycélium extraradiculaire (Maldonado-Mendoza et al., 2001 ; Benedetto et al., 2005). Enfin, récemment, une attention particulière s'est portée sur le rôle des aquaporines en ce qui concerne le transport de l'eau et des nutriments entre les deux partenaires de la symbiose mycorhizienne arbusculaire (Uehlein et al., 2007). Les aquaporines, présentes dans de nombreux systèmes biologiques, constituent un système de diffusion facilitée à travers les membranes qui sont ainsi perméables à différentes molécules de petites tailles ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ) pouvant être échangées entre le champignon et les racines.

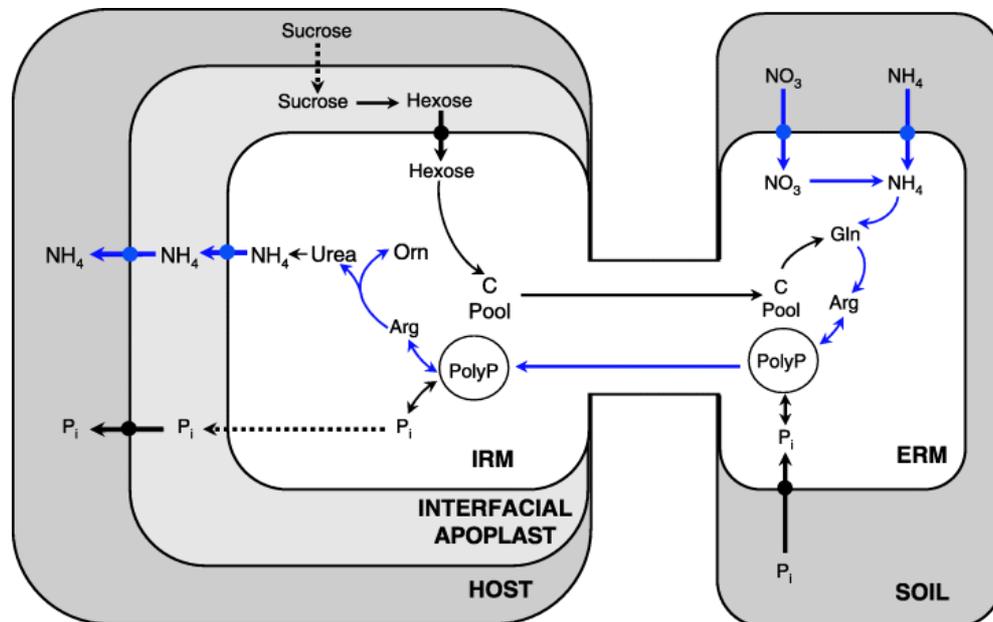


Figure 10 : Transport et métabolisme de l'azote et du phosphore dans un système (racine de carotte transformée – champignon MA). L'azote inorganique ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) est prélevé par le mycélium extraradiculaire (ERM) du champignon, assimilé et incorporé dans les acides aminés (principalement arginine (Arg)). Arg est ensuite co-transporté avec des polyphosphates (PolyP), issus du phosphore inorganique (Pi) prélevé par l'ERM, vers le mycélium intraradiculaire (IRM). Dans l'IRM, Arg est alors transformé en urée et ornithine, qui donnent, sous l'action de l'uréase et de l'ornithine aminotransférase, du  $\text{NH}_4^+$  qui peut être transféré à la plante hôte, de même que les phosphates. En échange, le pool de C non utilisé par la plante est transporté vers l'ERM. (Jin et al., 2005).

### 3. Effets et protection des champignons MA

Si la symbiose mycorhizienne arbusculaire est autant répandue dans le monde végétal, c'est parce qu'elle est bénéfique à la plante sous plusieurs aspects : en fournissant des nutriments à la plante, les champignons MA ont un effet fertilisant, ils jouent aussi un rôle dans la stabilité du sol et enfin, ils ont un effet protecteur vis-à-vis des stress abiotiques et biotiques.

#### a. Amélioration de la croissance et de la nutrition des plantes

L'effet majeur des champignons mycorhiziens dans les écosystèmes non perturbés est l'amélioration de la croissance des plantes mycorhizées par rapport aux plantes non mycorhizées (Plenchette et al., 1983 ; Karagiannidis et Hadjisavva-Zinoviadi, 1998). L'accroissement de la biomasse végétale est lié à l'apport de nutriments limitants par le champignon. En effet, en explorant un plus vaste volume de sol que les racines, le mycélium des champignons MA permet de supplémer la nutrition de la plante en éléments limitants. Dans certains cas de sols acides ( $\text{pH} < 5$ ), où ce sont des éléments comme Ca, Mg ou K qui sont déficients, les plantes mycorhizées montrent ainsi des concentrations foliaires en ces éléments supérieures aux plantes non mycorhizées (Clark, 1997). Mais le plus souvent, ce sont les composés azotés et les phosphates qui sont les facteurs limitants pour la croissance de la plante et il a été bien montré, en utilisant des dispositifs à compartiments, que les hyphes extraradiculaires du champignon sont capables de prélever et de transporter ces éléments jusqu'aux racines, en particulier le phosphore (Cooper et Tinker, 1978 ; Jakobsen et al., 1992b ; Cui et Caldwell, 1996). Le phosphore est en effet prélevé sous forme d'orthophosphates (phosphate inorganique  $\text{P}_i$ ) par les plantes, or cette forme minérale du phosphore est en quantité limitée dans le sol et, sous l'action du prélèvement racinaire, il se crée rapidement des zones d'appauvrissement autour des racines à cause d'un apport relativement lent en P de la part de la phase solide du sol et de la faible diffusion de P dans le sol. La présence du champignon est donc essentielle pour explorer le sol à la recherche de cet élément peu mobile et fournir à la plante ce dont elle a besoin pour se développer. Pour accéder aux pools de phosphore du sol inaccessibles aux plantes, les champignons MA seraient capables d'hydrolyser le P organique en P inorganique pour le transférer à la plante hôte (Koide et Kabir, 2000). Par contre, contrairement aux ectomycorhizes et aux endomycorhizes éricoïdes, trouvées dans des sols à fortes teneurs en matière organique, les

mycorhizes à arbuscules n'ont pas de propriétés ligninolytiques permettant de minéraliser les éléments nutritifs dans les sols très organiques, ce qui indique une certaine adaptation des différents types de champignons mycorhiziens à leur habitat (Read et Perez-Moreno, 2003). L'amélioration du prélèvement des éléments limitants est ainsi associée à une augmentation de la biomasse des plantes mycorhizées, néanmoins l'efficacité de cet effet est variable selon les conditions de sol (teneur en P, C organique, pH, CEC, texture...) mais aussi selon l'association plante – champignon (Monzon et Azcón, 1996 ; Jakobsen et al, 1992a).

b. Effet sur la structure du sol

Un autre effet des champignons MA est leur action sur la structure du sol. Les hyphes fongiques ont la propriété d'agir sur la macroaggrégation des constituants du sol et donc sur la stabilité du sol (Tisdall et al., 1991). La stabilité des sols est très importante dans la lutte contre l'érosion, la perte des nutriments et de la matière organique par lixiviation, qui entraînent une baisse de la productivité en agriculture (Schreiner et Bethlenfalvay, 1995). L'enchevêtrement des racines fines et du mycélium fongique joue un rôle physique dans la liaison des microaggrégats (diamètre < 250  $\mu\text{m}$ ) entre eux pour former des macroaggrégats (> 250  $\mu\text{m}$ ) stables, la stabilité de ces macroaggrégats étant corrélée à la longueur d'hyphes dans le sol (Miller et Jastrow, 1990 ; Tisdall, 1994). La liaison des microaggrégats est due à la production en grande quantité de polysaccharides par le mycélium extraradriculaire ; les champignons MA produisent en effet une glycoprotéine : la glomaline (Wright et Upadhyaya, 1998) qui influence la stabilité du sol et dont la concentration dans les sols dépend de la plante hôte et du champignon associé (Rillig et al., 2002). Cette protéine fongique a été identifiée comme étant un homologue d'une « heat shock protein » qui est une protéine de réponse au stress (Gadkar et Rillig, 2006). Les conditions de stress seraient en effet un facteur influençant la production de glomaline car celle-ci est produite en plus grande quantité lorsque la croissance du mycélium est limitée (Rillig et Steinberg, 2002).

c. Protection contre les stress abiotiques et biotiques

Une troisième caractéristique très intéressante des champignons MA est leur effet protecteur pour la plante hôte, que ce soit face à des stress abiotiques ou biotiques. Les stress osmotiques (sécheresse et salinité) sont des stress abiotiques fréquemment rencontrés par les plantes et l'association avec les champignons MA permet de réduire les symptômes du stress

en complément des mécanismes protecteurs intrinsèques de la plante (Ruiz-Lozano, 2003). La réponse des plantes mycorhizées en condition de sécheresse se traduit par de meilleurs taux de transpiration et de photosynthèse, une conductance stomatique et des teneurs en N et P dans les feuilles plus élevées et donc une meilleure croissance que les plantes non mycorhizées (Ruiz-Lozano et al., 1995). Les mécanismes impliqués dans la protection des plantes mycorhizées face au stress hydrique seraient liés à une meilleure nutrition phosphatée qui améliore la photosynthèse et accroît la biomasse de la plante, mais aussi à un meilleur accès à l'eau du sol et au maintien de l'équilibre hydrique dans la plante (Augé, 2001).

La contamination des sols en divers polluants, dont les ETM, constitue un autre stress abiotique qui peut être atténué par la symbiose MA. Les mycorhizes à arbuscules favorisent en effet la croissance des plantes sur des sols contaminés par les métaux lourds (Leyval, 2005). Gildon et Tinker (1983) ont été parmi les premiers à mettre en évidence cet effet protecteur des champignons MA pour la plante face à des fortes concentrations en métaux (Zn et Cd). Depuis, l'influence des champignons MA sur la croissance des plantes dans des milieux contaminés en éléments traces métalliques et le prélèvement de ces éléments a fait l'objet de nombreux travaux. Par exemple, la croissance de différentes plantes sur des résidus miniers contaminés en cuivre est améliorée lorsqu'elles sont colonisées par *Glomus mosseae* (Chen et al., 2007). La colonisation *in vitro* de racines transformées par *Glomus intraradices* permet aussi de réduire l'inhibition de la croissance racinaire par le cadmium (Janoušková et Vosátka, 2005). Cette protection conférée par les champignons MA serait ainsi utilisée par les plantes métalphytes (par exemple : *Viola lutea* ssp. *calaminaria*) pour mieux se développer et coloniser les sols fortement pollués en métaux (Hildebrandt et al., 2007). De plus, les souches de champignons MA isolées de sites contaminés et donc tolérantes aux métaux (Weissenhorn et al., 1993) auraient un meilleur effet protecteur pour la plante hôte que des isolats fongiques non-tolérants (Gildon et Tinker, 1983 ; Hildebrandt et al., 1999). Cet effet positif du champignon sur la croissance de la plante est souvent lié à une augmentation du prélèvement du phosphore en même temps qu'une diminution de la concentration en métaux dans les parties aériennes des végétaux (Heggo et al., 1990 ; Lee et George, 2005). C'est principalement cette baisse de la concentration en métaux dans les parties aériennes des plantes mycorhizées, en partie due à l'augmentation de biomasse (« effet dilution ») mais aussi à l'immobilisation des métaux dans la rhizosphère, qui permet d'atténuer l'effet toxique des métaux pour la plante (Audet et Charest, 2006 ; Kapoor et Bhatnagar, 2007).

Les champignons MA sont capables de transporter, en plus des éléments essentiels, différents éléments non-essentiels (métaux ou radionucléides) tels que Cd (Joner et Leyval, 1997 ; Hutchinson et al., 2004), U (Rufyikiri et al., 2004 ; Chen et al., 2005) ou Cs (Dupré de Boulois et al., 2008) du sol au système racinaire et de les séquestrer dans les racines grâce à la capacité de fixation du mycélium extraradiculaire (Galli et al., 1994 ; Janoušková et al., 2006), réduisant le passage dans les parties aériennes. Le mycélium extraracinaire a en effet une forte capacité de sorption des métaux, en particulier le mycélium d'isolats tolérants aux métaux (Joner et al., 2000). La localisation ultrastructurale de métaux tels que Zn, Cd et Cu dans le mycélium fongique a permis de montrer que l'accumulation de ces ETM se fait surtout dans la paroi fongique et dans les vacuoles des champignons MA (Turnau et al., 1993 ; González-Guerrero et al., 2008). Kaldorf et al. (1999) ont aussi pu mettre en évidence une accumulation de métaux (Fe, Ni et Zn) plus importante dans les cellules corticales de maïs contenant des arbuscules que dans les cellules des plantes non mycorhizées. Il n'a toutefois pas été clairement établi si les métaux sont immobilisés dans la cellule végétale, dans l'arbuscule, dans les deux ou à l'interface des deux (espace périarbusculaire).

En plus de la diminution de l'exposition aux métaux grâce à l'augmentation de la biomasse végétale et à la séquestration des polluants dans les structures fongiques, d'autres mécanismes de réponse peuvent être mis en jeu lors de la symbiose mycorhizienne (Meharg, 2003). L'utilisation de techniques de biologie moléculaire a en effet permis de mettre en évidence l'expression de protéines impliquées dans la tolérance ou la détoxification des métaux lors de la colonisation des plantes par des mycorhizes (Repetto et al., 2003). La production par le champignon de protéines de réponse au stress oxydatif, comme observé chez des champignons ectomycorhiziens (Schützendübel et Polle, 2002), pourrait entrer en jeu dans l'atténuation du stress métallique. Des gènes codants pour des transporteurs et pour des protéines de protection contre le stress métallique (« heat-shock proteins », glutathion transférase) sont en effet surexprimés dans les racines de pois (*Pisum sativum*) mycorhizées (Rivera-Becerril et al., 2005). L'expression, pendant le stade présymbiotique, d'un gène codant pour une métallothionéine dans les hyphes de *Gigaspora margarita* en présence de Cu et Cd (Lanfranco et al., 2002) ou encore l'expression de gènes codants pour des protéines de protection contre le stress oxydant (superoxyde dismutase, oxidoreductases...) dans le mycélium de *G. intraradices* à fortes concentrations de Zn (Ouziad et al., 2005) montrent que les champignons possèdent des mécanismes intrinsèques pour lutter contre le stress oxydatif. En revanche, l'exsudation d'acides organiques, qui peuvent réduire la mobilité des métaux dans le sol, mécanisme observé chez les champignons ectomycorhiziens et les mycorhizes

éricoïdes, ne semble pas être développée chez les champignons MA (Meharg, 2003). Par contre, les mycorhizes à arbuscules produisent de la glomaline qui peut séquestrer les métaux dans les sols (González-Chavez et al., 2004) et ainsi réduire leur phytodisponibilité.

Néanmoins, l'effet protecteur des champignons MA face aux ETM est variable (Hildebrandt et al., 2007) et parfois l'inoculation par un champignon MA peut ne pas avoir d'effet positif sur la croissance de la plante (Killham et Firestone, 1983 ; Weissenhorn et Leyval, 1995). Le fonctionnement de la symbiose est complexe et dépend de nombreux paramètres contrôlant les systèmes sol-plante-champignon. L'influence du champignon MA en milieu contaminé varie selon le génotype de la plante hôte (Rivera-Becerril et al., 2002), selon l'isolat de champignon étudié (Gonzalez-Chavez et al., 2002) et donc selon le couple plante-champignon, certaines espèces végétales répondant mieux à la mycorhization que d'autres (Diaz et al., 1996). Le type de pollution, les concentrations en métaux dans les sols jouent aussi un rôle important (Lee et George, 2005). Ainsi lorsque la concentration totale en métaux dans le sol est faible, la présence du champignon augmente le prélèvement par la plante alors qu'en cas de fortes contaminations du sol les métaux ont tendance à être immobilisés dans la mycorrhizosphère (Leyval et al., 1997 ; Audet et Charest, 2007b). Les conditions édaphiques, en particulier le pH (El-Kherbawy et al., 1989), jouant sur la disponibilité des métaux, les concentrations en P (affectant la dépendance et la colonisation mycorhizienne (Jensen et Jakobsen, 1980)) et la densité racinaire (Joner et Leyval, 2001) influencent également l'effet des champignons MA sur le prélèvement des métaux par les plantes. Tous ces paramètres influençant le rôle de la symbiose mycorhizienne arbusculaire dans les sites pollués par les métaux doivent encore être étudiés et quantifiés pour prendre en compte la mycorhization dans les modèles de transfert des métaux aux plantes.

Enfin, l'interaction des champignons MA avec les autres organismes du sol en font un agent protecteur vis-à-vis du stress biotique provoqué par les pathogènes. La symbiose MA protège la plante des dégâts causés aux racines par des nématodes (Elsen et al., 2003), mais aussi par des champignons pathogènes tels que *Aphanomyces euteiches* (Thygesen et al., 2004) et diverses bactéries pathogènes (Filion et al., 1999). Cette protection des champignons MA contre les pathogènes est certainement liée à un ensemble de processus tels qu'une compétition pour la colonisation des racines et pour l'absorption des nutriments, une activation par le champignon des mécanismes de défense de la plante ou encore la production de substances fongiques perturbant le développement des pathogènes. Par ailleurs, l'interaction des champignons mycorhiziens avec les bactéries du sol entraîne aussi la

sélection d'une microflore rhizosphérique particulière (Offre et al., 2007) et peut potentiellement stimuler la croissance de la plante. En particulier, l'association champignon MA – bactéries fixatrices d'azote permet d'améliorer la nutrition phosphatée et azotée de la plante, favorisant son développement (Artursson et al., 2006). Cet effet est particulièrement intéressant en condition de stress métallique (Vivas et al., 2003).

Au-delà de l'effet bénéfique de la symbiose mycorhizienne au niveau individuel, comme le montre la plupart des études pour un couple plante-champignon particulier, la dimension multifonctionnelle des mycorhizes est aussi à prendre en compte à l'échelle de l'écosystème (Finlay, 2008). Alors qu'une relation positive et linéaire a été établie entre la diversité végétale et la productivité/stabilité des écosystèmes (Tilman et al., 1996), l'influence de la composante mycorhizienne est peu prise en compte dans la gestion du fonctionnement des écosystèmes. Pourtant, van der Heijden et al. (1998) ont montré que les champignons MA ont un effet positif sur la stabilité et la productivité des écosystèmes. La productivité maximale d'un écosystème est ainsi atteinte plus rapidement (i.e. avec un plus petit nombre d'espèces) en présence qu'en absence des champignons MA (Klironomos et al., 2000). En améliorant la nutrition des différentes espèces et la structure du sol, les champignons MA jouent ainsi un rôle clé dans la structuration des communautés végétales herbacées (van der Heijden et al., 2006). La présence d'un réseau mycélien dans le sol peut en effet favoriser la germination des graines et l'installation d'un plus grand nombre d'espèces végétales et augmenter la survie des différents individus composant l'écosystème.

## **V. Dépolluer les sols : notion de bioremédiation.**

### **1. Les différentes méthodes de dépollution**

L'accumulation de substances toxiques variées dans les écosystèmes, couplée au caractère non renouvelable de la ressource sol, oblige la société humaine à mettre en place des moyens pour dépolluer les sols (remédiation). Face à la demande croissante de surfaces cultivables, la question de la reconversion des sites pollués est en effet de plus en plus fréquente. La pollution par les métaux est particulièrement problématique à cause de leur persistance dans l'environnement, alors que les pollutions organiques sont dégradables. La sélection de la méthode de remédiation la plus appropriée dépend ainsi du type de pollution, mais aussi des caractéristiques du site, des concentrations en contaminants, et surtout du

devenir du site. Les méthodes les plus employées actuellement sont des techniques physico-chimiques, souvent onéreuses, lourdes à mettre en place et peu respectueuses de l'environnement ; des méthodes émergentes exploitant des processus biologiques (bioremédiation) ont vu le jour mais celles-ci méritent encore d'être optimisées et sont encore peu utilisées (Mulligan et al., 2001). Le but de la remédiation étant de réduire au maximum le risque d'exposition aux contaminants, la meilleure solution est de retirer les polluants du milieu (extraction), mais cela n'est pas toujours possible et l'immobilisation ou l'isolement des polluants peut permettre d'assurer l'innocuité de la pollution. La décontamination et la réhabilitation des sols pollués doit donc passer par une définition des objectifs, de la faisabilité et des risques du ou des traitements. Les objectifs peuvent viser, soit à retrouver les propriétés originelles du sol, soit à se limiter à une diminution des risques en fonction des usages envisagés (plantations forestières, terres agricoles, terrains de jeux, lotissements...) (Bourelle et Berthelin, 1998).

Tableau 7 : Résumé des techniques de remédiation des sols pollués par les métaux.

Technologie	Description	Application
<i>Isolement/Immobilisation</i>		
Confinement	Installation de barrières d'isolation étanches pour empêcher le mouvement des fluides	<i>In situ</i>
Solidification	Injection d'agents solidifiants pour créer un déchet inerte	<i>In situ</i>
Vitrification	Application d'énergie électrique pour vitrifier les contaminants	<i>In situ</i>
Immobilisation chimique	Amendements des sols pour diminuer la mobilité des métaux	<i>In situ</i>
<i>Séparation physico-chimique</i>		
Hydrocyclone, gravimétrie, flottation	Séparation des particules de sol contaminées en fonction de leur taille	<i>Ex situ</i>
Séparation magnétique	Séparation grâce aux propriétés magnétiques des métaux	<i>Ex situ</i>
Séparation pyrométallurgique	Evaporation de certains métaux par cuisson	<i>Ex situ</i>
Lixiviation chimique	Lavage des sols avec des agents chimiques pour solubiliser les polluants	<i>Ex situ</i>
Soil flushing (lixiviation <i>in situ</i> )	Création d'un courant d'eau (mélange eau-solvant) pour chasser les polluants vers un lieu de pompage	<i>In situ</i>
Électromigration	Application d'un courant électrique pour faire migrer les contaminants	<i>In situ</i>
<i>Méthodes biologiques</i>		
Remédiation microbiologique	Utilisation du métabolisme des microorganismes pour modifier la forme chimique des polluants	<i>Ex situ</i>
Phytoremédiation	Utilisation de plantes pour extraire ou stabiliser les métaux	<i>In situ</i>

a. Les techniques physico-chimiques (Mulligan et al., 2001)

- L'isolement/immobilisation de la pollution :

La technique la moins coûteuse consiste à installer des barrières physiques (acier, ciment, bentonite...) pour confiner la pollution métallique et empêcher sa diffusion dans les milieux adjacents (confinement). Sans isoler complètement la zone polluée, des systèmes de barrières sélectives drainantes ont aussi été développées pour piéger les polluants. Autrement, les contaminants peuvent être immobilisés par encapsulation (solidification) dans une matrice solide après injection d'agents solidifiants (monomères liquides qui polymérisent, pouzzolane, bitumes ou autres ciments). Ce traitement peut être réalisé *in situ* ou après excavation (*ex situ*), les processus de remédiation *ex situ* étant plus courants car les mélanges sont plus faciles à réaliser. Enfin, on peut réaliser une vitrification du milieu pollué en y insérant des électrodes pour le porter à très haute température (1600-1800°C) et le faire fondre. Le substrat se solidifie alors en refroidissant, immobilisant les polluants.

- Les techniques de séparation physique ou chimique :

Les différents traitements *ex situ* qui peuvent être réalisés sont des procédés de séparation mécanique des particules du sol (hydrocyclone, gravimétrie et flottation) en fonction de leurs tailles (les grosses particules étant généralement moins polluées que les particules fines), de séparation magnétique, basée sur les propriétés magnétiques des métaux, ou de séparation pyrométallurgique qui consiste à cuire le substrat pollué entre 200 et 700°C pour évaporer les contaminants. Les sols excavés peuvent aussi être « lavés » par lixiviation chimique (« soil washing ») grâce à l'ajout d'acides inorganiques ( $\text{HSO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ) ou organiques (acide acétique, acide citrique) ou d'agents complexants (EDTA) pour solubiliser les polluants. Le lavage des sols implique l'utilisation d'une unité de traitement sur le site pour décontaminer la solution de lixiviation chargée en polluants. Parmi les procédés de remédiation *in situ*, il faut citer la méthode électrocinétique (électromigration) et le « soil flushing ». L'électromigration utilise deux électrodes plantées dans le sol pour y faire passer un faible courant électrique, les ions et particules chargés présents dans la solution de sol sont alors transportés entre les électrodes. Les anions viennent s'accumuler au niveau de la cathode et les cations au niveau de l'anode et peuvent ensuite être extraits. Le « soil flushing » consiste à nettoyer le sol à l'aide d'un courant d'eau (contenant des agents chimiques ou non) afin de chasser les contaminants qui se solubilisent dans l'eau vers un lieu de captage et d'extraction, cette technique est évidemment fortement dépendante de la perméabilité du

milieu. Les sols peuvent enfin être traités chimiquement par oxydation (ajout de permanganate de potassium, peroxyde d'hydrogène, hypochlorite ou gaz chlorés) ou réduction (ajout de métaux alcalins : Na, SO<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, sulfites) ou neutralisation (ajustement du pH des sols acides ou basiques) dans le but de détoxifier, précipiter ou solubiliser les métaux.

b. Utilisation des organismes vivants pour la remédiation

Alors que certaines techniques de remédiation physico-chimiques sont régulièrement utilisées, la bioremédiation et surtout la phytoremédiation méritent d'être plus développées. La bioremédiation emploie des méthodes naturelles qui n'ont donc pas un impact négatif sur l'écosystème et dont le coût peut être moins élevé que celui d'autres techniques. Par contre, la limitation principale de ce type de remédiation est la lenteur du procédé et la difficulté à bien maîtriser les mécanismes biologiques.

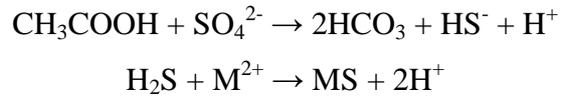
- La remédiation microbiologique :

Il s'agit d'utiliser des microorganismes (majoritairement des bactéries) pour modifier la forme chimique des polluants afin de les extraire du sol ou les immobiliser.

Les microorganismes sont impliqués dans les cycles biogéochimiques des métaux par une variété de processus biochimiques qui influencent la spéciation et la mobilité des métaux. Ainsi, selon les conditions et selon les microorganismes, l'action microbienne peut soit mobiliser soit immobiliser les métaux, ces différents processus pouvant être exploités en bioremédiation (Gadd, 2004 ; Hazen et Tabak, 2005). La mobilisation des métaux permet de les extraire de la matrice solide du sol, dans ce cas les propriétés microbiennes qui peuvent être exploitées sont la lixiviation, la dissolution des composés métalliques insolubles, la chélation par des métabolites, dont les sidérophores, et la biométhylation. La lixiviation autotrophe par des bactéries acidophiles (du genre *Thiobacillus*) qui permet de solubiliser le fer et d'autres métaux en produisant H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a déjà des applications industrielles, non pas en bioremédiation mais en « biomining » qui vise à extraire certains métaux précieux des sols.

Le processus de biolixiviation en tas ou en bioréacteur permet d'extraire les métaux à l'aide de bactéries du genre *Acidithiobacillus*, par exemple, dans des conditions particulières (aérobie, pH acide, entre 15 et 55°C). Les propriétés oxydantes ou réductrices des bactéries peuvent aussi être utilisées pour transformer les métaux en des formes moins toxiques, par exemple la réduction du Cr(VI) en Cr(III) rend moins mobile et moins toxique cet élément

(Desjardin et al., 2002), ou encore les bactéries sulfato-réductrices qui permettent de précipiter les métaux (M) sous forme de sulfure métallique (MS) selon :



Enfin, la biométhylation, réaction chimique qui ajoute un groupement méthyle au métal (Se, As, Hg, principalement), permet de le volatiliser (Thayer, 2002). Cette réaction de méthylation peut être réalisée par de nombreux organismes vivants et aurait un rôle de détoxification (Gadd, 1993b).

Mais, au même titre que les différents phénomènes de lixiviation hétérotrophes mettant en jeu une acidification du milieu ou la dissolution par réactions redox des métaux piégés sous formes d'oxydes, phosphates ou sulfures, la dissolution des métaux par les microorganismes est plutôt développée en laboratoire dans des réacteurs ou en biopiles. De même, des méthodes de solubilisation des métaux grâce à la production de sidérophores sont en développement. Par contre, la technique de volatilisation des métaux par biométhylation a déjà été réalisée avec succès sur un site contaminé en sélénium, et peut potentiellement être appliquée à d'autres métaux tels que le mercure et l'arsenic, mais il convient de bien surveiller le processus car il y a un risque de transfert des polluants dans l'atmosphère.

Dans certains cas, il peut être préférable d'immobiliser les polluants. La capacité de biosorption des microorganismes est déjà bien utilisée pour traiter les eaux polluées. La biomasse microbienne peut en effet fixer les métaux par adsorption, liaison sur la paroi cellulaire ou accumulation dans les structures intracellulaires. L'utilisation de biomasse fixée (biofilm) de bactéries, cyanobactéries, algues ou champignons en bioréacteurs fait ainsi déjà l'objet d'applications pour fixer les polluants présents dans des suspensions de sols, boues ou eaux usées. D'autre part, la production par les microorganismes de toute une gamme de composés fixant les métaux (acides organiques, polysaccharides, métallothionéines...), ou encore la précipitation des métaux par changement de leur état d'oxydation (bactéries sulfato-réductrices) ou sous forme de phosphates (par *Citrobacter* sp. par exemple) et de carbonates, sont des propriétés qui sont à l'étude et qui méritent d'être développées (White et al., 1997).

Quoiqu'il en soit, l'utilisation des microorganismes en bioremédiation est plutôt prometteuse pour des traitements *ex situ*, en bioréacteurs ou en biopiles, où les conditions de croissance de la biomasse microbienne peuvent être contrôlées précisément. En conditions *in situ*, à cause des risques de transfert des polluants, les techniques d'immobilisation sont préférables aux techniques de mobilisation. Toutefois, les traitements *in situ* ont l'avantage

d'être moins coûteux que les traitements *ex situ* et d'être applicables à des contaminations diffuses, diluées ou inaccessibles. Les techniques de bioremédiation *in situ* peuvent être de trois types selon l'action qui est réalisée : on parle de bioaugmentation lorsque l'on ajoute dans l'environnement pollué des microorganismes sélectionnés pour leurs propriétés ; de biostimulation lorsque l'on ajoute des donneurs/accepteurs d'électrons ou des nutriments pour stimuler les microorganismes indigènes ; et d'atténuation naturelle lorsque la capacité de bioremédiation intrinsèque du milieu est utilisée. Or, rares sont les cas où la bioaugmentation a montré de meilleurs résultats que la biostimulation (Hazen et Tabak, 2005). Avec les outils moléculaires et génétiques actuels qui permettent une meilleure compréhension du métabolisme des microorganismes et qui offrent la possibilité de sélections et de modifications génétiques, la bioingénierie peut constituer une approche intéressante pour l'amélioration de la bioremédiation *in situ* par les microorganismes.

- La phytoremédiation :

Une autre approche de la bioremédiation *in situ* est l'utilisation des plantes comme outil de dépollution (phytoremédiation) pour extraire les polluants du sol (phytoextraction et phytovolatilisation) ou réduire leur mobilité (phytostabilisation) (Chaney et al., 1997). Beaucoup d'espoirs reposent sur l'emploi de plantes pour dépolluer les sols car cette technologie peu coûteuse a le mérite de ne pas être destructrice pour l'environnement. La phytostabilisation est particulièrement intéressante pour reconstruire un couvert végétal sur des sites fortement perturbés tels que les anciennes mines (Mendez et Maier, 2008) et pour réduire la lixiviation des polluants vers les eaux souterraines. Citons aussi la phytovolatilisation basée, comme pour les microorganismes, sur la méthylation des métaux et déjà applicable pour des métaux comme le sélénium.

En phytoextraction, l'emploi de plantes hyperaccumulatrices, capables de tolérer de fortes concentrations en métaux dans leurs parties aériennes et ainsi de les extraire du sol, ou de plantes à forte biomasse (McGrath et al., 2001) a été proposé depuis une quinzaine d'années (Cunningham et al., 1995) mais le processus est très lent et le devenir de la biomasse végétale contaminée qui est récoltée est problématique. Le problème de la contamination de la chaîne alimentaire via les herbivores est aussi un point à ne pas négliger. Néanmoins, les technologies « vertes » sont bien reçues par l'opinion publique et méritent d'être développées. Bien que très peu de projets de phytoextraction au champ aient été réalisés, des études de faisabilité ont été menées pour évaluer le potentiel de cette technologie. De nouvelles études

mesurant les bilans de matière et la quantité d'éléments extraite doivent donc être menées pour rendre la phytoremédiation applicable (Meagher, 2000).

Ainsi, pour Robinson et al. (2003) la phytoextraction doit, d'une part, satisfaire les réglementations en matière d'environnement par la minimisation du risque de transfert des polluants pendant les cultures et doit, d'autre part, être économiquement attractive. Le coût de la phytoextraction doit alors être comparé à celui de la meilleure technologie alternative de remédiation ainsi qu'au coût de l'inaction. La lenteur du processus de phytoextraction peut alors être contrebalancée par le faible coût de l'opération et peut même être préférée si elle amène du profit (sylviculture par exemple). D'après Van Nevel et al. (2007), pour que la phytoextraction soit réellement applicable, il faut que la quantité de métal extraite soit largement augmentée étant donné que les quantités calculées sont encore loin d'être suffisantes pour baisser suffisamment les concentrations dans un délai raisonnable et que ces quantités sont bien souvent surestimées. En effet, des cultures successives sur un même sol impliquent une baisse de l'extractibilité des métaux au cours du temps et une baisse de la fertilité et donc du rendement de la culture. De plus, l'efficacité de la phytoextraction diminue lors de la présence de plusieurs métaux (pollution polymétallique) et lorsque les concentrations en métaux sont trop élevées (Audet et Charest, 2007a). Il peut dans ce cas être préférable de s'orienter vers la phytostabilisation de ce genre de sites extrêmement pollués pour les revégétaliser et limiter les phénomènes d'érosion.

## 2. Optimisation de la phytoremédiation

Plusieurs pistes sont à explorer pour améliorer la phytoremédiation et surtout la phytoextraction (Lasat, 2002).

- L'utilisation d'agents solubilisants ou chélatants : Déjà expérimentée de nombreuses fois, l'addition de produits chélatants (EDTA par exemple) dans le sol pour augmenter la disponibilité des métaux permet d'induire une plus forte accumulation de ces polluants dans les plantes (Leštan et al., 2008). Mais la forte mobilisation des métaux provoquée par l'amendement entraîne des risques de lixiviation vers les eaux souterraines et peut provoquer des signes de phytotoxicité chez les plantes cultivées ou inhiber le développement microbien (Grěman et al., 2001 ; Neugschwandtner et al., 2008). De plus, l'EDTA est un composé peu dégradable qui peut poser des risques environnementaux, le développement d'agents chélatants biodégradables aussi efficace que l'EDTA est donc nécessaire (Leštan et al., 2008).

- La transgénèse : Un autre axe de recherche exploré pour améliorer les performances des plantes en phytoremédiation, est celui de la génétique. Il a en effet été proposé de modifier génétiquement des plantes à forte biomasse pour accroître leur tolérance aux métaux (Krämer et Chardonnens, 2001), grâce à des gènes impliqués dans les mécanismes de l'hyperaccumulation, ou alors de modifier des plantes hyperaccumulatrices pour accroître leur biomasse. Les mécanismes de tolérance aux métaux sont beaucoup étudiés et de mieux en mieux compris, ainsi la surexpression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans ces mécanismes (synthèse de glutathions et de phytochélatines par exemple) semble être l'approche génétique la plus prometteuse (Yang et al., 2005 ; LeDuc et Terry, 2005). Néanmoins, la création d'organismes génétiquement modifiés pose des problèmes éthiques et de nombreuses précautions devront être prises dans le cas où l'usage *in situ* de plantes transgéniques serait accepté par l'opinion publique.

- L'inoculation de microorganismes sélectionnés : Enfin, une troisième approche permettant d'améliorer le rendement des plantes en phytoextraction est leur association avec des microorganismes sélectionnés (bactéries ou mycorhizes) qui peuvent influencer la mobilité des métaux et le prélèvement par le système racinaire (Lasat, 2002). En effet, l'influence des bactéries sur la spéciation des métaux du sol ainsi que les capacités d'exploration et de transport des champignons mycorhiziens sont des phénomènes rhizosphériques qui modifient le prélèvement par la plante et qui méritent d'être exploités de manière plus approfondie dans le cadre de la phytoremédiation.

L'idée d'utiliser des champignons MA pour améliorer la phytoremédiation a été proposée depuis plusieurs années (Leyval et al., 1997 ; Khan et al., 2000 ; Göhre et Paszkowski, 2006), étant donné le caractère ubiquitaire de ces champignons, leur rôle central dans les interactions sol-microorganismes-plantes et leur effet protecteur pour la plante (voir paragraphe IV.3.b.). Pourtant, le nombre d'études portant sur l'emploi des champignons MA en phytoremédiation est faible car, dans ce domaine, l'attention s'est plus fréquemment focalisée sur les plantes hyperaccumulatrices dont les espèces (*Brassicaceae* et *Caryophyllaceae*) forment rarement des mycorhizes. Or, la « mycorhizoremédiation », l'utilisation des mycorhizes en phytoremédiation comme agents biofertilisant, biostimulant et bioprotecteurs, mérite une plus grande attention (Khan, 2006). Un bon développement de la biomasse végétale étant un pré-requis indispensable en phytoremédiation, les champignons MA représentent un outil prometteur car ils sont connus pour améliorer la nutrition des plantes et leur croissance en conditions de stress biotique et abiotique (Leyval, 2005). De plus, le mycélium fongique est

capable de transporter différents polluants jusqu'aux racines et de les immobiliser dans la rhizosphère (Joner et Leyval, 1997), ce qui est intéressant en phytostabilisation. L'augmentation du volume de sol exploré par les racines mycorhizées comparé aux racines non mycorhizées permettrait ainsi de « nettoyer » un plus grand volume de sol contaminé, même si cela concerne seulement les horizons de surface, colonisés par les plantes. Toutefois, une quantification de la contribution des champignons mycorhiziens au transfert des polluants, en particulier des métaux, à la plante est nécessaire pour effectuer des bilans sur les quantités d'éléments extraites, mais peu d'études ont abordé cet aspect. Les souches de champignons MA indigènes isolés de sites pollués et ainsi adaptés au stress semblent avoir le meilleur potentiel pour améliorer la phytoremédiation (Gaur et Adholeya, 2004). Mais il faut encore tester une large variété d'isolats fongiques et les comparer entre eux pour sélectionner les champignons les plus efficaces. Wang et al. (2005) ont par ailleurs montré que l'inoculation de *Elsholtzia splendens* par un consortium de champignons MA isolé d'une ancienne mine de cuivre améliore la phytoextraction de Cu, Zn, Pb et Cd.

De plus, la coinoculation de plantes avec des champignons MA et des rhizobactéries nodulantes (PGPR) donne de bons résultats pour améliorer la croissance des plantes sur des sols pollués (Khan, 2005). Ainsi, l'association *Glomus macrocarpum* – *Bradyrhizobium* permet d'augmenter la biomasse du soja en présence de plomb (Andrade et al., 2004), de même, l'interaction *Glomus mosseae* – *Brevibacillus brevis* améliore la tolérance du trèfle au cadmium (Vivas et al., 2005).

Enfin, l'utilisation de plantes à très forte biomasse telles que des arbres permettrait d'améliorer l'efficacité de la phytoremédiation. Des études sur le peuplier, pré-inoculés avec des champignons MA, ont ainsi donné des résultats prometteurs pour la phytostabilisation du cuivre (Todeschini et al., 2007) ou pour la phytoextraction du zinc (Lingua et al., 2008), même si une optimisation, avec la sélection de cultivars de peupliers appropriés et de l'inoculum mycorhizien adéquate, est nécessaire.

# Objectifs



## Objectifs de l'étude

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (MA) colonisent la majorité des plantes herbacées et, en tant que lien direct entre la matrice du sol et les racines, ils tiennent un rôle prépondérant dans le transfert des éléments aux plantes. Ces champignons symbiotiques sont des acteurs majeurs de la rhizosphère, ils modifient le prélèvement par la plante des éléments essentiels mais aussi non-essentiels tels que les éléments traces métalliques (ETM). Parmi ces éléments, le cadmium (Cd) est particulièrement toxique et mobile, son transfert aux plantes doit donc être étroitement surveillé. La croissance de plantes sur des sols contaminés en Cd, la mesure du Cd prélevé par les plantes et l'influence des champignons MA sur ce prélèvement ont déjà fait l'objet de nombreuses études. Néanmoins, même si des effets bioprotecteurs et biofertilisant des champignons MA ont été régulièrement rapportés, l'intensité de ces effets mycorhiziens est variable selon les conditions et les propriétés du milieu contaminé, la plante hôte et l'inoculum mycorhizien étudiés. De plus, la quantification du Cd transféré à la plante mycorhizée par rapport à une plante non mycorhizée et l'évaluation de la contribution des champignons MA à la quantité de Cd extraite du sol par les plantes sont nécessaires et les mécanismes impliqués dans ce transfert ont encore besoin d'être éclaircis.

Les objectifs de ces travaux de thèse ont été, dans un premier temps, de quantifier la contribution d'un champignon MA (*Glomus intraradices*) isolé d'un sol contaminé au transfert de Cd à la légumineuse modèle *Medicago truncatula* dans des cultures en pot. Il s'agissait d'évaluer la variabilité de l'influence de ce champignon sur le transfert sol-plante de Cd dans différentes conditions édaphiques, notamment en prenant en compte la biodisponibilité de Cd. Les résultats publiés dans la littérature montrent des différences dans l'effet sur la croissance des plantes et sur l'absorption des métaux par la plante en fonction des champignons utilisés, et il a été suggéré que les champignons isolés de sols pollués et/ou tolérants aux métaux seraient plus efficaces. Dans une deuxième expérience, nous avons ainsi comparé cette souche de *G. intraradices* à d'autres isolats de champignons MA provenant ou non de sols contaminés en métaux.

Dans la suite de ce travail, l'objectif a été d'affiner un peu plus le rôle du champignon MA en déterminant la capacité de prélèvement de Cd du mycélium fongique. Pour cela, deux types de dispositifs à compartiment ont alors été développés et employés, avec l'utilisation de cadmium radioactif ( $\text{Cd}^{109}$ ) comme traceur. Le premier a permis de réaliser des cinétiques de

## Objectifs

sorption de Cd et de mesurer la capacité de sorption de Cd par des plantes mycorhizées et non mycorhizées, en séparant les hyphes fongiques des racines. Le deuxième type de dispositif a été utilisé pour déterminer l'accessibilité de différents pools de Cd au mycélium extraracinaire.

L'ensemble des expériences réalisées visaient à déterminer les effets que peuvent avoir les champignons MA sur le transfert et l'accumulation de Cd dans les différents compartiments du système sol-plante-champignon et à quels niveaux ces champignons agissent, comme schématisé dans la figure 11. Le champignon peut potentiellement transporter lui-même le Cd à partir de la solution de sol, influencer le prélèvement racinaire, la translocation vers les parties aériennes et/ou modifier la liaison du Cd sur la matrice solide du sol.

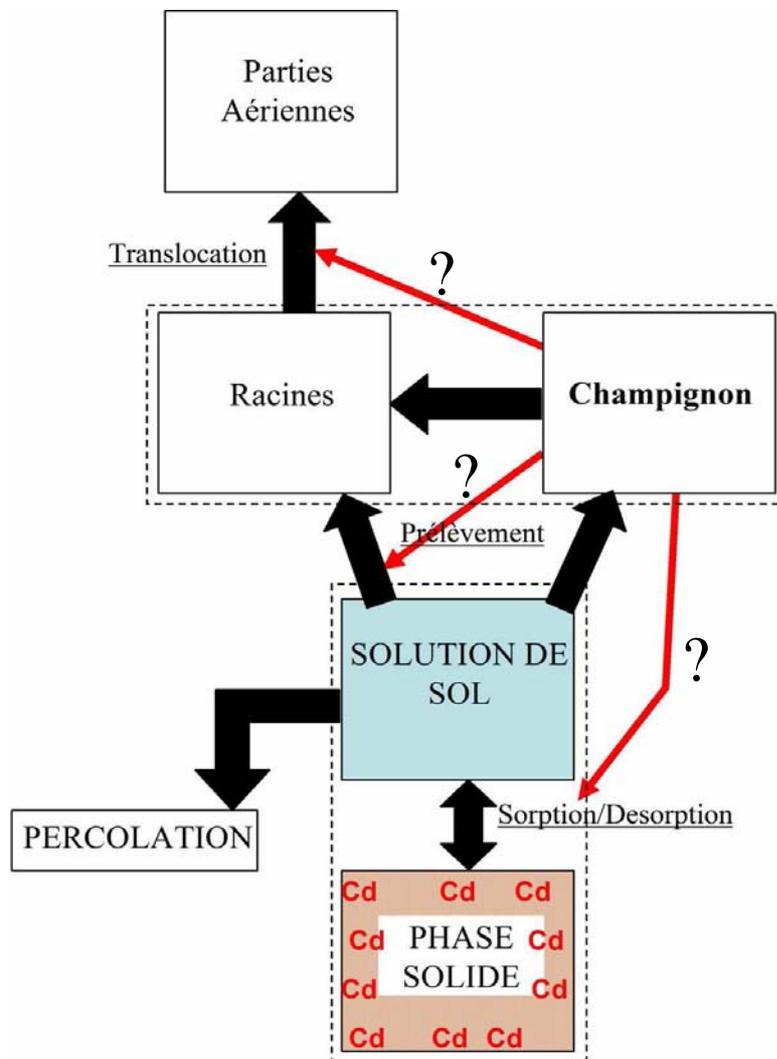


Figure 11 : Schéma illustrant l'influence possible (flèches rouges) d'un champignon mycorhizien à arbuscule (MA) sur le transfert (flèches noires) et le bilan de cadmium (Cd) dans un système sol-plante-champignon.

## **Partie 2**

# **Matériel & méthodes**



## Matériel et méthodes

### I. Les objets d'étude

L'étude du transfert de cadmium (Cd) dans un système sol-plante-champignon a été réalisée sur les organismes modèles suivants :

- *Medicago truncatula* comme plante hôte
- *Glomus intraradices* comme champignon mycorhizien à arbuscules (MA), par ailleurs comparé à d'autres champignons MA (voir paragraphe I.2).

#### 1. La plante hôte

Une luzerne (*Medicago truncatula* Gaertn. lignée J5), "barrel medic" en anglais, a été utilisée comme plante hôte tout au long des travaux présentés. Cette espèce rustique de luzerne, proche de la luzerne cultivée (*Medicago sativa*), possède un petit génome déjà séquencé (2 x 8 chromosomes, taille haploïde < 500 Mpb) et environ 4 fois plus gros que celui d'*Arabidopsis thaliana*. De nombreux écotypes de *Medicago truncatula* ont pu être collectés dans sa région d'origine que constitue le bassin Méditerranéen, et étant donné son fort polymorphisme (Bonin et al., 1996), un grand nombre de variations phénotypiques ont été observées. La qualité d'autofécondation de cette luzerne, son temps de génération court et sa grande production de graines (Cook, 1999) en font un très bon modèle végétal de plus en plus utilisé dans le monde ([www.medicago.org](http://www.medicago.org)), en particulier pour la génétique moléculaire des symbioses racinaires: la symbiose fixatrice d'azote avec des bactéries du sol appartenant au genre *Rhizobium* et la symbiose endomycorhizienne avec les champignons de l'ordre des Glomales. Ces interactions microorganismes-plantes étant inexistantes chez *Arabidopsis*, *Medicago truncatula* constitue la légumineuse modèle pour l'étude des symbioses racinaires ([www.noble.org/MedicagoHandbook/](http://www.noble.org/MedicagoHandbook/)).

Concernant le comportement de *Medicago truncatula* en présence d'éléments traces métalliques, peu d'études ont porté sur la tolérance aux métaux des types sauvages de cette espèce luzerne. La forte plasticité phénotypique de *Medicago truncatula* et une mutagenèse aisée (Penmetsa et Cook, 2000) font que cette plante est surtout utilisée pour l'étude des réponses au stress métallique d'un point de vue génétique et moléculaire comme l'expression

de transporteurs (López-Millán et al., 2004) ou alors lors de l'établissement d'une symbiose mycorhizienne en présence de métaux (Hildebrandt et al., 2007). Néanmoins, *Medicago truncatula* a été cultivée sur du sable en présence ou non d'un champignon mycorhizien avec des concentrations en cadmium allant de 0 à 20 mg kg<sup>-1</sup> (A. Golotte, communication personnelle). En présence de 2 mg kg<sup>-1</sup>, les plantes non inoculées se développaient beaucoup moins bien qu'en absence de métal. A 10 mg Cd kg<sup>-1</sup>, les biomasses aériennes et racinaires étaient encore plus faibles et à 20 mg Cd kg<sup>-1</sup> la majorité des plantes étaient mortes avant la fin de la culture.

## 2. L'inoculum mycorhizien

*Glomus intraradices* est le champignon MA choisi pour notre étude. La souche utilisée a été isolée par l'équipe du Professeur H. Bothe (Université de Cologne, Allemagne) (Hildebrandt et al., 1999) et est commercialisée par l'Institut für Pflanzenkultur (Solkau, Allemagne). Ce champignon est tolérant aux pollutions métalliques, c'est-à-dire qu'il est capable de se développer et de coloniser le système racinaire d'une plante dans un sol contaminé par des éléments traces métalliques (métaux lourds).

Dans l'expérience présentée au chapitre 2, ce champignon, noté *Glomus intraradices* n°1 (Gi n°1), est comparé à d'autres champignons MA, tolérants ou non aux métaux :

- *Glomus intraradices* n°2 (Gi n°2), isolé d'un sol non-contaminé mais néanmoins tolérant aux métaux (Gianinazzi-Pearson, communication personnelle) et répertorié dans la Banque Européenne des Glomales ([www.kent.ac.uk/bio/beg](http://www.kent.ac.uk/bio/beg)) sous la référence BEG 141.
- *Glomus mosseae* P2 (Gm P2), isolé d'un sol contaminé par les métaux et tolérant (Weissenhorn et al., 1993), répertorié sous la référence BEG 69.
- *Glomus mosseae* (Gm), isolé d'un sol non contaminé et non tolérant aux métaux (Weissenhorn et al., 1993) et répertorié sous la référence BEG 12.
- *Glomus* sp. (Gsp), champignon du genre *Glomus* mais non identifié (enregistré sous la référence DAOM 225952), isolé d'un sol agricole exposé pendant 10 ans à des épandages de boues d'épuration peu polluées en métaux (Joner et al., 2000).

### 3. Les substrats de culture

Deux des sols utilisés proviennent de deux sites historiquement contaminés par des retombées atmosphériques issues d'anciennes usines métallurgiques :

- sol Hist-6.1 : sol agricole situé à 800 m d'un ancien complexe métallurgique de production de métaux non ferreux et d'une usine de production d'acide sulfurique ayant fonctionnés entre 1901 et 1968 à Mortagne-du-Nord (59). Ce sol, principalement contaminé par les retombées atmosphériques de l'usine, est utilisé dans le programme TOXNUC.
- sol Hist-7.7 : sol agricole échantillonné à plusieurs centaines de mètres de l'usine MetalEurope, fondée en 1893 à Noyelles-Godault (62). Cette usine de production de Zn et de Pb, qui a arrêté son activité en 2003 et dont le démantèlement a été opéré entre 2003 et 2006, fut à l'origine de nombreux rejets atmosphériques qui ont contaminés ses environs en métaux pendant tout le 20<sup>ème</sup> siècle.

Deux autres échantillons de sols agricoles (sols Exp-7.4 et Exp-5.3), non contaminés, proviennent de la ferme expérimentale de La Bouzule (Champenoux, Meurthe-et-Moselle), ils ont été échantillonnés à deux endroits différents du site et ont des pH différents.

Les propriétés de ces quatre sols (Tableau 1), broyés et tamisés à 2mm, ont été caractérisées au Laboratoire d'Analyses des Sols d'Arras (INRA). Les sols non pollués Exp-7.4 et Exp-5.3 ont été artificiellement contaminés en Cd afin d'obtenir quatre sols avec une gamme croissante de Cd extractible au nitrate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1M) (Symeonides and McRae, 1977) (Tableau 2). Les extractions au nitrate d'ammonium ont été réalisées en triplicats avec des prises d'essai de 5 g de sol sec extraits par 50 mL de solution de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1M après agitation mécanique pendant 2 heures à température ambiante. La suspension a ensuite été centrifugée pendant 15 minutes à 4000 tr/min et filtrée sur filtre de porosité moyenne sans cendres pour doser le Cd extrait au spectromètre par absorption atomique avec four graphite.

Tableau 1 : Caractéristiques des sols utilisés au cours des travaux présentés.

Nom du sol		Exp-7.4	Hist-7.7	Hist-6.1	Exp-5.3
Granulométrie (g kg <sup>-1</sup> )	Origine	La Bouzule K	MétalEurope	ToxNuc	La Bouzule T
	Sables (50 – 2000 µm)	130	209	529	110
	Limons (2 – 50 µm)	570	574	367	530
	Argiles (< 2 µm)	300	217	104	270
Texture		Limoneux-argileux fin	Limoneux fin	Limono sableux	Limoneux-argileux fin
Type de pollution		Contaminé avec CdSO <sub>4</sub>	Pollution historique	Pollution historique	Contaminé avec CdSO <sub>4</sub>
Cations échangeables* (cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> )	pH <sub>eau</sub>	7.4	7.7	6.1	5.3
	Ca	15.9	16.9	5.4	10.7
	Mg	0.69	0.93	1.48	1.67
	Na	0.035	0.082	0.022	0.065
	K	0.47	0.55	0.44	0.85
CEC* (cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> )		14.9	15.3	5.4	12.2
N total (g kg <sup>-1</sup> )		1.7	1.2	1.2	1.8
C organique (g kg <sup>-1</sup> )		16.0	16.6	15.3	15.0
C/N		9.4	13.5	13.3	8.2
CaCO <sub>3</sub> total (g kg <sup>-1</sup> )		8.62	7.78	2.47	1.58
P assimilable** (mg kg <sup>-1</sup> )		117	148	132	108
Concentrations totales en métaux (mg kg <sup>-1</sup> )	Cd	0.29	7.87	3.84	0.29
	Zn	148	627	489	114
	Pb	50	444	103	36
	Cu	35	25	19	27
	Fe (g kg <sup>-1</sup> )	56.6	22.6	12.2	56.4

\* CEC et cations échangeables mesurés après extraction au chlorure de cobaltihexammine (norme NF X 31-130).

\*\* P assimilable dosé par la méthode de Olsen (norme NF ISO 11263).

La contamination en Cd a été effectuée avec une solution de sulfate de cadmium (3CdSO<sub>4</sub>, 8H<sub>2</sub>O) selon le protocole suivant : 10% de la quantité désirée de sol sec est hydraté avec une solution de sulfate de cadmium de concentration voulue. Le mélange est bien homogénéisé et mis à sécher sous une sorbonne. Cette portion de sol sec contaminé est

mélangée avec le reste de sol et le tout est bien homogénéisé par retournements dans des sacs en plastique. Le sol contaminé de cette manière est mis à vieillir pendant 3 semaines à température ambiante.

Des concentrations en Cd totales croissantes ont été appliquées aux deux sols de La Bouzule (Exp-7.4 et Exp-5.3) et les concentrations extractibles au nitrate d'ammonium 1M ont été comparées à celles des sols Hist-6.1 et Hist-7.7. Finalement, les deux sols de La Bouzule ont été contaminés en Cd à  $6 \text{ mg kg}^{-1}$  pour obtenir la gamme de concentrations présentée dans le tableau 2. Après contamination, les sols ont été stérilisés aux rayons gamma (25 kGray) au CEA de Cadarache pour éliminer tous les champignons mycorhiziens indigènes des sols.

*Tableau 2 : Concentrations en Cd dans les sols étudiés avant culture et après contamination avec  $\text{CdSO}_4$  et vieillissement pendant 3 semaines (pour les sols Exp-7.4 et Exp-5.3). En gras sont représentés les % de Cd extractible au  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  par rapport au Cd total.*

Sol	Exp-7.4	Hist-7.7	Hist-6.1	Exp-5.3
Cd total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	6.29	7.87	3.84	6.29
Cd extractible au $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	0.2	0.8	0.6	1.7
<b>(% du Cd total)</b>	<b>(3.3%)</b>	<b>(9.8%)</b>	<b>(16.7%)</b>	<b>(27.0%)</b>
Cd extractible à l'eau ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	0.02	0.02	0.02	0.14

Lorsque des substrats « propres » (sable, billes de verre) ont été utilisés (chapitre 3 et 4), ces substrats ont été lavés à l'acide nitrique 10% et rincés à l'eau osmosée jusqu'à ce que le pH revienne à 6-7.

## II. Méthodes et dispositifs utilisés

### 1. Désinfection des graines de luzerne et germination

Avant chaque mise en culture les graines de luzernes sont désinfectées. Elles sont trempées dans différents bains selon le protocole suivant (Norini, 2007) et rincées 2 fois à l'eau distillée entre chaque bain :

- Ethanol 50% pendant 5 min
- Hypochlorite de calcium 20% pendant 10 min
- Chloramine T 2% + 1 goutte de TWEEN 80 pendant 10 min
- Streptomycine 2% pendant 10 min
- Rinçage 2 fois à l'eau distillée

Après désinfection, les graines sont mises à germer sur vermiculite humide stérilisée à l'autoclave. Âgées de quelques jours, les plantules sont ensuite transplantées dans les dispositifs de culture.

## 2. Isolement des spores de champignons mycorhiziens

Les spores de *G. mosseae* P2 (BEG 69), *G. mosseae* (BEG 12) et *Glomus* sp. ont été extraites dans une solution de saccharose à 500 g.L<sup>-1</sup> à partir de cultures pièges maintenues au laboratoire sur poireaux (*Allium porrum*). 10g de substrat de ces cultures sont mélangés à 50 mL de solution de sucrose 500 g.L<sup>-1</sup> dans un tube à centrifugation. Après une agitation manuelle énergique, la suspension est centrifugée à 2500 rpm à 10°C pendant 3 min. Le surnageant contenant racines et spores est filtré sur tamis fin (porosité 50 µm) et rincé à l'eau du robinet. Le refus du tamis est récupéré sur papier filtre et papier absorbant puis observé à la loupe binoculaire pour isolement et comptage des spores de champignon.

## 3. Dispositifs expérimentaux

Dans un premier temps (expériences 1 et 2), des expériences de culture en pots ont été menées sur des sols agricoles contaminés. Un dispositif simple (Figure 1) a été mis en place pour recueillir les lixiviats d'une culture en pot de luzernes inoculées ou non et quantifier le transfert de Cd dans le système sol-plante-lixiviat.

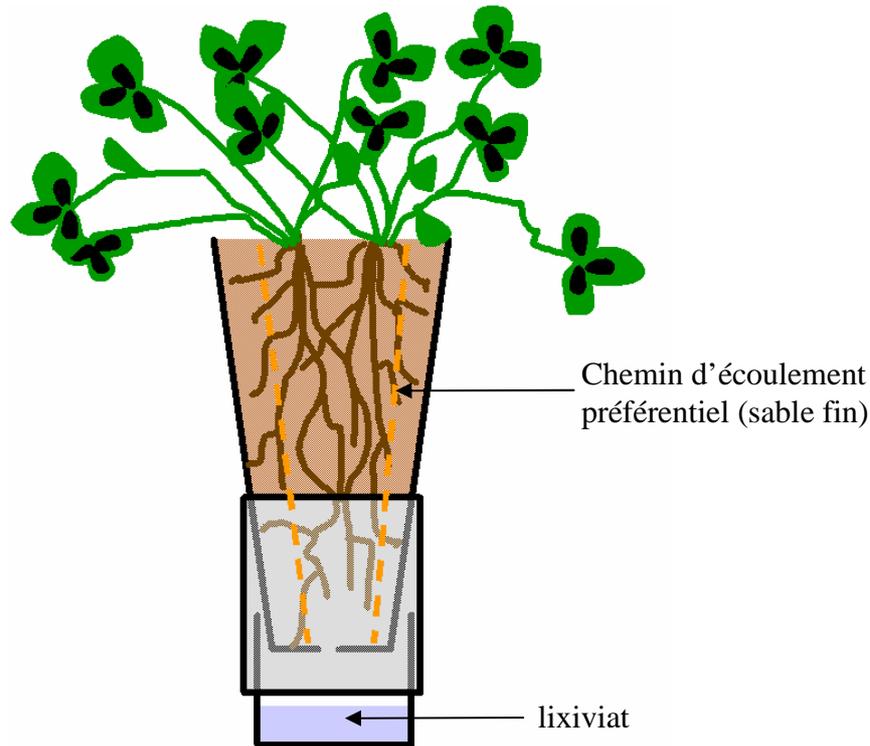


Figure 1 : Pot de culture et système de récolte des lixiviats.

a. Expérience 1 : cultures en pots avec différents sols contaminés

Une première expérience a été menée pour quantifier l'effet du champignon MA étudié sur le bilan de Cd dans la plante et les lixiviats en fonction de la disponibilité du Cd dans quatre sols différents, et ainsi déterminer l'effet des conditions de sol sur la contribution du champignon au transfert de Cd.

Dans cette expérience, chaque pot a été rempli avec environ 1 kg d'un des 4 sols étudiés stérile + 10g d'inoculum de *G. intraradices* n°1 stérilisé à l'autoclave (traitement Non Mycorhizé, NM) ou non (traitement Mycorhizé, M). Cinq répétitions par traitement ont été réalisées. Chaque pot a été réinoculé avec la microflore bactérienne autochtone du sol étudié. Pour cela, une solution de chaque sol non stérile a été préparée dans un flacon en verre stérile : le sol est mélangé avec une solution de NaCl 0,8% (sol:solution 1:10) et 6 g de billes de verre par g de sol. Le tout est agité pendant 1h, puis la suspension est filtrée sur filtre plissé. Le filtrat recueilli est ensuite filtré à 5  $\mu\text{m}$  à l'aide d'une pompe à vide pour éliminer les spores des champignons mycorhiziens indigènes du sol. Chaque pot a alors été inoculé avec 10 mL de cette solution de sol filtrée. Six plantules prégermées de luzernes ont ensuite été transplantées par pot puis éclaircies à 3 plantules par pot au bout de 5 jours. La culture a été maintenue pendant 45 jours à 70% de la capacité de rétention en eau du sol par ajout d'eau

distillée et fertilisée toutes les semaines avec une solution nutritive carencée en phosphore (1 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 1 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; 0.75 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 12.5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 2.5  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0.3  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.05  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.2  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.2  $\mu\text{M}$   $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 20  $\mu\text{M}$  Fe-EDTA). Ponctuellement, avant plantation et toutes les 2 semaines, les pots ont été arrosés à 100% de la capacité de rétention en eau pour recueillir les lixiviats dans des cristallisoirs en verre lavés à l'acide ( $\text{HNO}_3$ , 10%). Le volume, le pH et les concentrations en Cd de ces lixiviats ont été mesurés, après filtration à 45  $\mu\text{m}$ .

b. Expérience 2 : cultures en pots avec différents isolats de champignons MA

Dans cette 2<sup>ème</sup> expérience, l'objectif était de comparer l'influence de différents isolats (de sols contaminés ou non) de champignons MA sur le bilan de Cd dans le système sol-plante-lixiviat.

Des luzernes ont été cultivées, de la même manière que dans l'expérience 1, sur un seul sol (900 g du sol Hist-7.7 sec par pot) mais inoculées avec les différents champignons décrits précédemment (voir paragraphe 1.b). L'inoculation des plantes par *G. intraradices* n°1 et *G. intraradices* n°2 a été effectuée à partir d'inoculum complexes (du substrat à base de pierre volcanique contenant des racines sèches mycorhizées pour *G.i.* n°1 et du sol contenant des racines mycorhizées pour *G.i.* n°2), tandis que pour *G. mosseae* BEG 12, BEG 69 et *Glomus* sp. l'inoculation a été effectuée à partir de spores isolées. Ces inoculum étant disponibles sous des formes variées, les différents traitements ont dû être inoculés avec environ 100 g de mélange d'inoculum vivant et autoclavé comme suit :

- *Glomus intraradices* n°1 (*Gi* n°1): mélange d'inoculum *G. intraradices* n°1 + inoculum *G. intraradices* n°2 stérilisé,
- *Glomus intraradices* n°2 (*Gi* n°2): mélange d'inoculum *G. intraradices* n°2 + inoculum *G. intraradices* n°1 stérilisé,
- *Glomus mosseae* P2 (*Gm* P2), *Glomus mosseae* (*Gm*) et *Glomus* sp (*Gsp*): 200 spores + mélange d'inoculum stérilisés de *G. intraradices* n°2 et *G. intraradices* n°1,
- Non Mycorhizé (NM): mélange d'inoculum de *G. intraradices* n°1 et *G. intraradices* n°2 stérilisés.

Trois répétitions par traitement ont été réalisées. Les luzernes ont été cultivées pendant 45 j dans les mêmes conditions que l'expérience 1 : sol réinoculé avec la microflore bactérienne indigène du sol, trois plantules par pot, maintien de la teneur en eau du sol à 70% de la capacité de rétention en eau, arrosage hebdomadaire avec la solution nutritive carencée en P. Les lixiviats ont été recueillis tous les 15 jours après simulation d'une forte pluie (arrosage du sol à saturation) pour mesurer leur volume, leur pH et leur concentration en Cd après filtration à 45  $\mu\text{m}$ . Des traitements additionnels (en triplicats) inoculé par *G. intraradices* n°1 ou non mycorhizé ont également été cultivés sur un temps plus court (30 j) pour comparer les bilans de Cd à deux temps de culture différents.

c. Expérience 3 : dispositif à compartiment sans sol et cinétique d'absorption

Cette 3<sup>ème</sup> expérience visait à développer un dispositif de culture à compartiment avec des substrats simplifiés et évaluer la capacité de sorption du Cd en solution par la plante modèle pour ensuite déterminer la capacité de sorption du Cd à court terme d'une plante mycorhizée par rapport à une plante non mycorhizée.

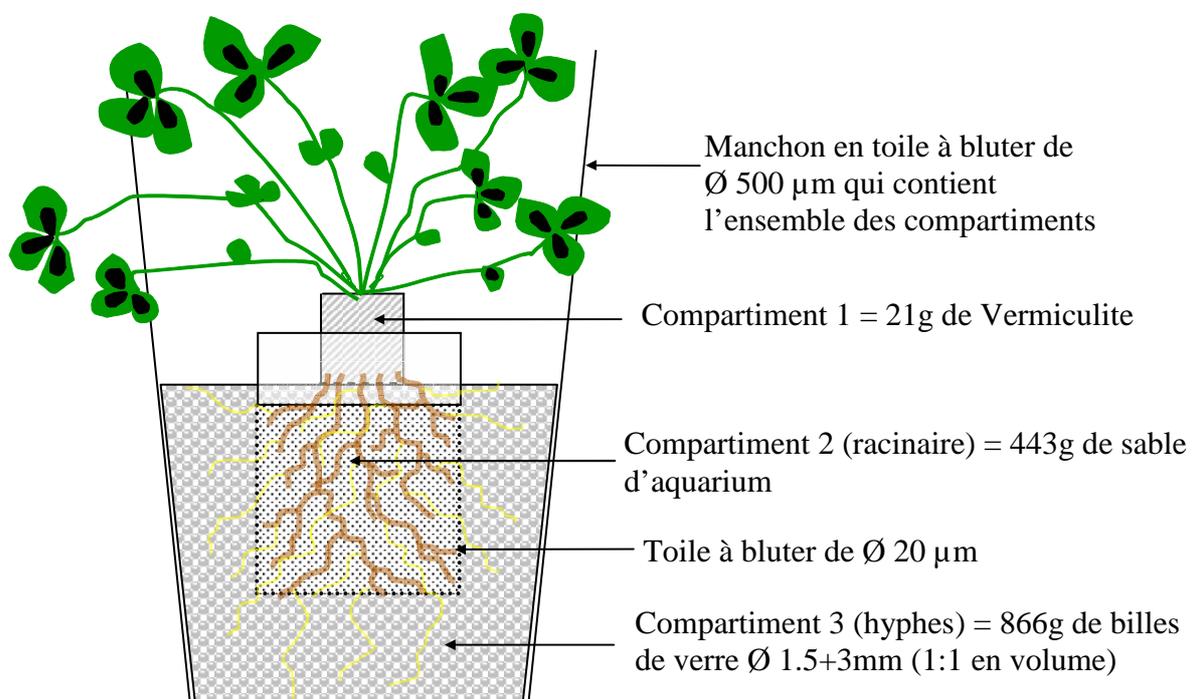


Figure 2 : Dispositif à compartiments pour l'étude de la cinétique d'absorption du Cd.

Des cultures de luzernes inoculées ou non ont été réalisées dans des dispositifs à compartiments d'1 L (Figure 2) avec du sable et des billes de verre (lavés à l'acide et stérilisés à 150°C) pour obtenir un compartiment où du mycélium fongique relativement pur peut se développer sans racines. Les luzernes non inoculées et inoculées ont été cultivées à différents temps : 45 j, 75 j, 100 j et 150 j. Les traitements mycorhizés ont été inoculés avec 300 mg de racines colonisées par *G. intraradices* n°1 placés entre les compartiments 1 et 2. Toutefois, la mycorhization ne s'étant pas bien développée, seules les plantes mycorhizées de 150 jours ont pu être analysées. Des dispositifs témoins non plantés ont aussi été réalisés. L'expérience a été menée avec 4 répétitions par traitement.

Tout au long des cultures, la teneur en eau du dispositif était maintenue à 60% de la capacité de rétention en eau par arrosage avec la solution nutritive carencée en P décrite précédemment (voir expérience 1) et les billes de verre du compartiment 3 ont été renouvelées avec des billes propres toutes les 3 semaines.

À chaque temps de culture étudié, une cinétique d'absorption du Cd par déplétion a été réalisée :

Le dispositif compartimenté est rincé avec une solution de  $\text{CaCl}_2$  à 0,5mM et plongé au temps  $t = 0$  dans un bain d'absorption (solution de Cd à 1,5mg/L +  $\text{CaCl}_2$  0,5mM à pH=5,5 et tamponnée avec du MES 20mM) marqué avec 1mL de source de  $\text{Cd}^{109}$  (environ 370kBq par pot). La solution est homogénéisée par agitation magnétique.

À différents temps de la cinétique (0 min, 5 min, 10 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h et 24h), 1mL de la solution marquée est prélevé pour doser au compteur gamma la quantité de radioactivité en solution.

À la fin de la cinétique, après ressuyage, le dispositif est trempé pendant 1 heure dans un bain de désorption de Cd non radioactif à une concentration 40 fois plus élevée (60mg/L) +  $\text{CaCl}_2$  à 0,5mM, à 4°C (bain de glace). 1mL de la solution de désorption est prélevé pour doser au compteur la quantité de radioactivité désorbée. Le dispositif a ensuite été rincé au  $\text{CaCl}_2$  0,5mM avant séparation des éléments du dispositif et récupération des biomasses végétales et fongiques, si présentes. Le mycélium mycorhizien présent dans le compartiment 3 est récolté par flottation en laissant décanter les billes de verre dans un grand volume d'eau après avoir agité avec une baguette en verre. L'eau est filtrée sur membrane pour récupérer les hyphes. Les hyphes sont rapidement séchés sur un papier absorbant et la masse fraîche est pesée. Les hyphes obtenus sont placés dans un flacon de comptage pour mesurer l'activité radioactive

contenue dans le matériel fongique. Les biomasses fraîches et sèches des parties aériennes et des racines sont également mesurées, ainsi que l'activité radioactive transférée à la plante.

d. Expérience 4 : dispositif à compartiment latéral

Dans cette dernière expérience, un dispositif de culture à compartiment latéral a été utilisé pour déterminer si les hyphes du champignon MA sont capables de prélever et de transporter du Cd provenant de pools plus ou moins fixés sur la matrice solide du sol.

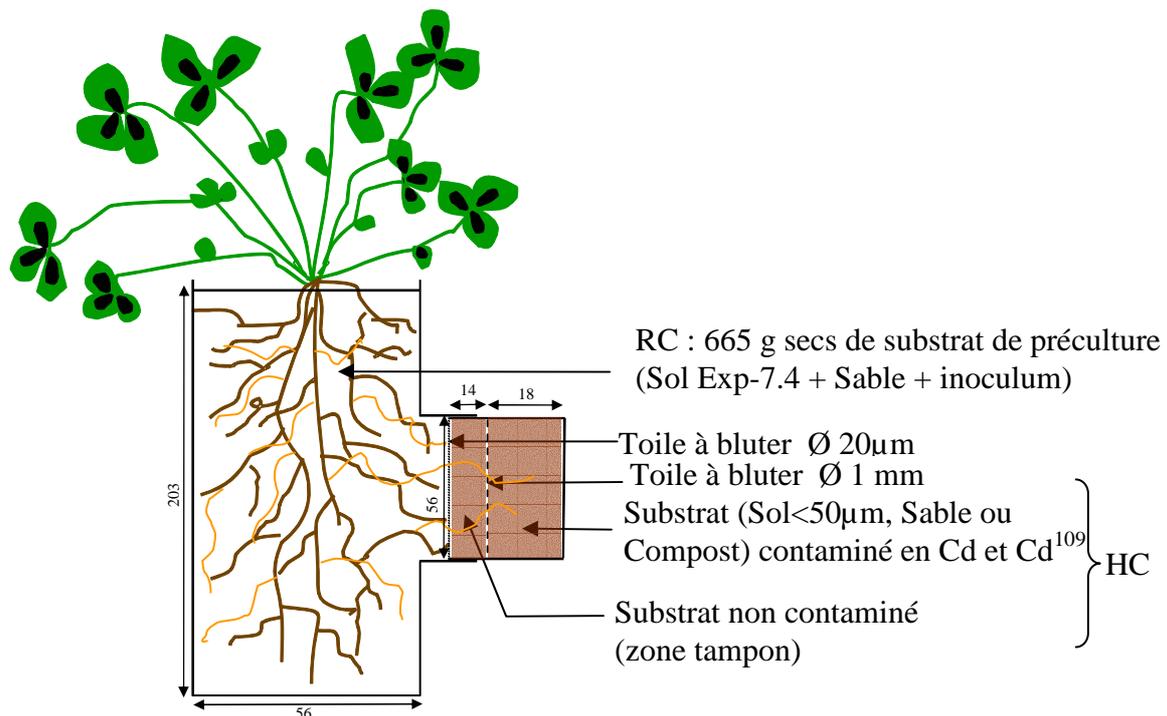


Figure 3 : Dispositif à compartiment latéral. RC = Root Compartment; HC = Hyphal Compartment. Les dimensions sont en millimètres.

Le dispositif à compartiment (Joner & Leyval, 1997) utilisé pour laisser l'accès à différents substrats contaminés seulement aux hyphes fongiques est schématisé dans la figure 3. Un plant de luzerne par pot, mycorhizé (M) ou non (NM), a d'abord été cultivé dans le compartiment central (Root Compartment RC) pendant 3 semaines, sans compartiment latéral. Le compartiment RC a été rempli avec un mélange de sol Exp-7.4 (59%), de sable d'aquarium (30%) et d'inoculum de *G. intraradices* (11%) (% en masse). Dans les traitements non mycorhizés l'inoculum de *G. intraradices* a été autoclavé. Trois substrats contrastés (Sable d'aquarium, Compost, fraction < 50 µm du sol Exp-7.4) ont été choisis, après extractions séquentielles et extraction au CaCl<sub>2</sub> 1 M, pour être contaminés en Cd. Les extractions

séquentielles du Cd (adaptée d'après Ahnstrom et Parker, 1999) ont été effectuées sur des échantillons de 2,0 g de substrat sec dans des tubes à centrifugation de 50 mL et à raison de 2 répétitions par substrat. Les différents traitements chimiques ont permis de définir 5 fractions de Cd :

- Fraction 1 (F1) : « soluble-échangeable »

15 mL de nitrate de d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1 M) sont ajoutés à l'échantillon sec et agités mécaniquement pendant 2h à température ambiante. Après centrifugation pendant 10 min à 1225 g, le surnageant est filtré sur papier filtre Whatman #42 et le filtrat est recueilli dans une fiole de 50 mL. L'opération est réalisée 2 fois, en reprenant le surnageant filtré dans la même fiole. Le résidu est rincé avec 5 mL de NaCl 0,1 M, centrifugé et la solution de rinçage est ajoutée dans la fiole de 50 mL qui est complétée avec de l'eau ultra pure jusqu'au trait de jauge.

- Fraction 2 (F2) : « acido-soluble »

30mL d'acétate de sodium (NaOAc 1 M), ajusté à pH 5 avec de l'acide acétique, sont ajoutés au résidu de la fraction 1 et agités pendant 5h à température ambiante. On ouvre le flacon de temps en temps pour évacuer le  $\text{CO}_2$ . Après centrifugation et filtration comme pour F1, le filtrat est recueilli dans une fiole de 100 mL. L'opération est également réalisée 2 fois et le résidu rincé avec 5 mL de NaCl 0,1 M.

- Fraction 3 (F3) : « Oxydable »

On fait réagir le résidu de la fraction 2 avec 5 mL d'hypochlorite de sodium ( $\text{NaOCl}$  5%), ajusté à pH 8,5 avec HCl, pendant 30 minutes à 90-95°C avec le flacon entrouvert. Les tubes sont agités toutes les 15 minutes. La suspension est ensuite centrifugée et le surnageant est filtré et recueilli dans une fiole de 50 mL. L'opération est réalisée 3 fois en reprenant toujours le surnageant filtré dans la même fiole. Le résidu est ensuite rincé avec 5 mL de NaCl 0,1 M comme précédemment.

- Fraction 4 (F4) : « Réductible »

On mélange enfin le résidu de la fraction 3 avec 20mL d'un mélange d'acide oxalique (0,2 M), d'oxalate d'ammonium (0,2 M) et d'acide ascorbique (0,1 M), ajusté à pH 3 avec NaOH, pendant 30 minutes à 90-95°C. Les tubes sont agités toutes les 15 minutes. La suspension est ensuite centrifugée et le surnageant est filtré et recueilli dans une fiole de 100mL. L'opération est réalisée 3 fois et le résidu est rincé avec 5 mL de NaCl 0,1 M comme précédemment.

- Fraction 5 (F5) : « Résiduelle »

La fraction 5 est calculée à partir de la concentration totale en Cd mesurée par fusion alcaline et de la somme des fractions F1 à F4.

Les concentrations en Cd dans chacune des fractions obtenues à l'issue de l'extraction séquentielle ont été mesurées par ICP-AES. La fraction F1 constitue le pool de Cd échangeable, c'est-à-dire faiblement lié à la matrice solide et facilement prélevé par les organismes vivants. La fraction F2 permet de quantifier le pool de Cd lié aux carbonates, la fraction F3 le Cd lié à la matière organique et la fraction F4 indique la quantité de Cd liée aux oxydes (Ahnstrom et Parker, 1999).

Pour déterminer la quantité de Cd à ajouter aux trois substrats une extraction simple au chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$  1M), sensée bien refléter la quantité de Cd phytodisponible (Young et al., 2000 ; Menzies et al., 2007), a aussi été réalisée : 2,0 g de substrat sec sont mélangés à 15 mL de  $\text{CaCl}_2$  1M, agités pendant 2h à température ambiante puis centrifugés 10 minutes à 1225 g et filtrés. Le filtrat est dilué dans 25 mL d'eau ultra pure et le Cd est dosé à l'ICP-AES. Le Cd étant plus extractible dans le sable (79% du Cd total extrait par  $\text{CaCl}_2$  1M) que dans le compost et le sol < 50  $\mu\text{m}$  (53% et 54% du Cd total extraits, respectivement), ces substrats, dilués à 30% en volume avec du sable fin (100 – 500  $\mu\text{m}$ ) ont été contaminés comme précédemment décrit à raison de 6 mg Cd  $\text{kg}^{-1}$  pour le sable et 9 mg Cd  $\text{kg}^{-1}$  pour le compost et le sol < 50  $\mu\text{m}$ . Une fois contaminés, les substrats ont été autoclavés 2 fois à 24h d'intervalle, réinoculés avec la microflore du sol Exp-7.4 (solution de sol filtrée à 5 $\mu\text{m}$ ) et laissés à vieillir pendant 2 semaines. Le compartiment latéral (Hyphal Compartment, HC) du pot a ensuite été rempli avec ces substrats contaminés en fonction du traitement (sable : 86,1 g sec; compost : 48,5 g sec; Sol : 63,7 g sec) puis marqué au  $\text{Cd}^{109}$  (sable : 1 MBq soit 11,6 kBq/g ; compost : 1,47 MBq soit 30,3 kBq/g ; sol : 1,47 MBq soit 23,1 kBq/g) et recouverts de substrats non contaminés et non marqués (zone tampon). Trois répétitions par traitement ont été réalisées.

Après 2 jours de vieillissement, le compartiment HC est inséré dans le dispositif et la culture est poursuivie pendant 1 mois sous une rampe de néons (lumière blanche pour aquarium, 16h de photopériode) en zone contrôlée. L'humidité relative est maintenue à 60% par un brumisateur.

#### 4. Conditions de culture

Les plantes ont été cultivées dans une chambre phytotronique en conditions contrôlées avec 16 h de photopériode, 22°C jour /18°C nuit, un éclairage de 400  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  et 80% d'humidité relative.

### III. Analyses

#### 1. Biomasse végétale

A la fin de la culture, les parties aériennes des plantes sont coupées, les racines sont séparées du substrat de culture et les biomasses fraîches sont pesées. Une partie des racines fraîches est conservée pour la détermination de la colonisation mycorhizienne et le reste est mis à sécher à l'étuve à 60°C, de même que la totalité des parties aériennes. Les poids secs sont ensuite mesurés.

#### 2. Colonisation mycorhizienne du système racinaire

La colonisation mycorhizienne du système racinaire est évaluée après coloration au Bleu Trypan (Koske and Gemma, 1989) : des tronçons de racines propres d'environ 1 cm sont mis pendant une nuit dans 5 ml d'éthanol 50%. L'éthanol est vidé et remplacé par 5 mL de KOH 5%. Après 15 min de contact, ces racines sont chauffées au bain marie pendant 15 min. Après refroidissement, elles sont rincées 4-5 fois à l'eau du robinet sur tamis fin. Les racines sont ensuite neutralisées pendant une nuit dans 5 mL d'acide chlorhydrique 1% puis placées pendant une demi-journée dans une solution de Bleu Trypan à 0,5% dans du lactoglycérol (1:1:1 acide lactique, glycérol et eau). Enfin, les racines sont rincées à l'eau distillée et placées dans 5 mL de solution de décoloration (glycérol acidifié) jusqu'à la préparation des lames. Pour chaque pot, trois lames sont préparées avec 2 fois 5 fragments racinaires colorés au Bleu Trypan qui sont déposés délicatement, recouverts de glycérol 50% et de lamelles. Les lames sont lutées avec du vernis à ongle puis observées au microscope. La notation de l'infection mycorhizienne (5 classes) et de la richesse en arbuscules (4 classes) est effectuée d'après la méthode de Trouvelot et al. (1986) (Annexe 1).

#### 3. Mesure de la longueur des hyphes mycéliens

Dans les expériences 2 et 4, les hyphes présents dans le sol ont été extraits (protocole adapté de Miller et al., 1995, et Boddington et al., 1999) et la longueur d'hyphes déterminée par la méthode des intersections (d'après Giovanetti et Mosse, 1980, et Jakobsen et al., 1992a). Dans l'expérience 2, 1,0 g de sol rhizosphérique frais a été mis en suspension dans 200 mL d'eau distillée. Cette suspension de sol a été tamisée à 50 µm pour éliminer les particules

fines du sol et le refus du tamis remis en suspension dans 150 mL d'eau distillée. Les 150 mL de suspension ont ensuite été agités avec un barreau magnétique à grande vitesse pendant 10 secondes et laissés à décanter pendant 10 secondes. Le surnageant a alors été tamisé à 50 µm et les particules restantes dans le tamis ont été resuspendues dans 100 mL d'eau distillée pour être filtrées sous vide sur un filtre en nitrate de cellulose de 25 mm de diamètre et de porosité 1,2 µm. Le filtre est trempé dans une solution de Bleu Trypan pendant 5 min puis rincé à l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de rinçage ne soit plus colorée.

Dans l'expérience 4, l'extraction des hyphes a été effectuée avec des dilutions. Les hyphes ont été extraits à partir de 2,0 g frais d'échantillon de substrat mis en suspension dans 250 ml d'eau ultra pure et agités par agitation magnétique à vitesse élevée. 5 ml de la suspension ont été dilués dans 250 ml d'eau ultra pure. Une aliquote de 5 ml de la suspension diluée a ensuite été filtrée sous vide sur le même type de filtre que pour l'expérience 2 et coloré au Bleu Trypan.

Le filtre est ensuite monté sur lame mince et observé au microscope (grossissement x100) muni d'un réticule. Le nombre d'intersections des hyphes avec les lignes horizontales et verticales du quadrillage du réticule est compté. Ce comptage est répété pour 25 champs de vision sur le filtre entier. La longueur totale d'hyphes R (cm) dans l'aire du réticule est alors calculée d'après la formule de Newman (1966):

$$R = n \times (\pi A / 2H)$$

avec A : Aire recouverte par le réticule = 1 mm<sup>2</sup>

n : nombre moyen d'intersections

H : longueur totale des lignes (40 lignes) = 40 mm

Cette longueur d'hyphes calculée est alors rapportée à la surface filtrable du filtre et, en fonction des dilutions effectuées et du ratio poids sec/poids frais de sol, on calcule la quantité d'hyphes présente par g de sol sec dans l'échantillon.

#### 4. Minéralisation des végétaux et mesure de la concentration en éléments minéraux

Les parties aériennes et racines sèches des plantes non exposées à de la radioactivité (Expériences 1 et 2) ont été broyées au mortier dans de l'azote liquide et minéralisées par digestion acide (200 mg d'échantillon sec dans 4 mL d'HNO<sub>3</sub> 65% + 2 mL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) dans des creusets en Teflon® à haute température et haute pression (170°C, 2 MPa, 1200 W, système à micro-ondes MARS 5). Après ajustement à l'eau ultra pure dans des fioles jaugées

de 25 mL, les concentrations en Ca, K, P, Mg, Pb, Zn dans les minéralisats ont été dosés par ICP-AES et les concentrations en Cd ont été dosées au spectromètre par absorption atomique avec four graphite.

#### 5. Mesure du Cd radioactif

Dans les expériences 3 et 4, les plantes ont été exposées à de la radioactivité donc par mesure de sécurité les tissus végétaux n'ont pas été minéralisés et les teneurs en éléments n'ont pas été mesurées. Des masses connues des parties aériennes et des racines récoltées, coupées en petits morceaux et séchées à l'étuve, ont été placées dans des flacons de comptage de 20 mL en polyéthylène. L'activité radioactive du Cd<sup>109</sup> contenu dans les tissus végétaux secs a ensuite été mesurée dans un compteur à rayonnement gamma (Wallac 1480 Wizard<sup>®</sup> 3). Le Cd radioactif sorbé sur les hyphes récoltés dans l'expérience 3 a aussi été mesuré, pour cela les hyphes frais ont été placés dans les flacons de stockage dans 5 mL d'eau ultra pure. Enfin, les échantillons de solution marquée prélevés tout au long de la cinétique d'absorption et placés dans des petits flacons de comptage (tubes Nunc-immuno MiniSorp<sup>™</sup> de 5 mL) ont aussi été dosés au compteur à rayonnement gamma.

#### 6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques entre les différents traitements appliqués lors des expériences menées au cours de ces travaux ont été menées avec les logiciels SigmaStat<sup>®</sup> et R. Des ANOVA One-way et Two-way, avec les tests de Tukey ou de Student-Neuwman-Keuls comme analyses de contrastes, des régressions linéaires et un ajustement par la méthode des moindres carrés ont été réalisées. En cas de non normalité des données et de non homogénéité des variances, une transformation en log des données ou des tests non-paramétriques équivalents (test de Mann-Whitney) ont été effectués selon le cas.

## **Partie 3**

# **Résultats & Discussion**



## **I. Expérience 1 : Effet d'un champignon MA sur le bilan de Cd en fonction des conditions du sol**

### Introduction/Objectif de l'expérience

Pour une meilleure gestion des sols pollués et pour améliorer les modèles de prélèvement des métaux par les plantes, il est nécessaire d'établir des bilans de matière dans le système sol-plante. La quantification des métaux transférés dans les différentes composantes du système, y compris dans les lixiviats, à l'issue d'une culture permet d'envisager une modélisation des flux et d'évaluer la faisabilité des méthodes de phytoremédiation. Or, la contribution des microorganismes, en particulier des champignons MA, est importante et doit être prise en compte pour mieux comprendre ces flux de métaux.

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (MA), champignons symbiotiques de la majorité des plantes herbacées, peuvent influencer la croissance des plantes et le prélèvement des éléments en traces métalliques (ETM) par les végétaux. Le transfert des ETM, dont le cadmium (Cd), est aussi fortement dépendant des caractéristiques du sol et l'influence des champignons MA peut varier d'un sol à l'autre. L'intensité de l'effet de la colonisation mycorhizienne sur le prélèvement du Cd par la plante est en effet plus ou moins prononcée selon les études menées sur le sujet.

L'expérience présentée dans ce premier chapitre visait à évaluer l'importance des sols étudiés sur la contribution d'un champignon MA, isolé d'un sol pollué, au transfert sol-plante de Cd. L'inoculation avec un champignon MA peut augmenter la biomasse de la plante hôte et réduire les concentrations en ETM dans les parties aériennes. Cet effet du champignon MA sur la croissance de la plante en milieu contaminé est lié à une amélioration de la nutrition végétale et à une protection face au stress métallique en partie due à une diminution de la translocation des métaux dans les parties aériennes de la plante. Le mycélium fongique est en effet capable de transporter le cadmium et de l'immobiliser dans le système racinaire. Mais quelle est la contribution du champignon MA à la quantité de Cd absorbée par la plante et cette contribution varie-t-elle en fonction des conditions édaphiques? Le transfert de Cd aux plantes dépend de sa disponibilité dans les sols et de la présence d'autres éléments, les différences observées entre des plantes mycorhizées et non mycorhizées sont-elles influencées par ces paramètres?

Pour répondre à ces questions et pour avoir une vue globale de notre système d'étude, une culture de luzernes en pot, inoculées ou non avec un champignon MA, a été réalisée sur quatre sols agricoles pollués en métaux. Des bilans de Cd dans le système sol-plante-lixiviat à partir de ces quatre sols contenant des concentrations différentes en Cd disponible ont ainsi pu être calculés. Parmi les quatre sols étudiés, deux sols étaient historiquement contaminés suite à des retombées atmosphériques d'industries métallurgiques et contenaient des concentrations relativement élevées en Cd, Zn et Pb. Les deux autres sols ont été contaminés artificiellement en Cd au laboratoire de manière à avoir quatre sols contenant des pourcentages de Cd extractible au nitrate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1M) croissants. La disponibilité des métaux, dont Cd, est principalement conditionnée par le pH du sol et peut être évaluée par différentes extractions chimiques. Les sels neutres ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ...) seraient les extractants qui reflètent le mieux les concentrations en métal dans la plante (Menzies et al., 2007) même si de telles extractions ne peuvent être exploitées qu'à titre indicatif et ne permettent pas de prédire la quantité de métal transférée aux plantes. L'extraction du Cd au nitrate d'ammonium est la technique qui a été choisie tout au long de ces travaux de thèse pour évaluer les concentrations en Cd disponible dans les sols étudiés. Beaucoup de pays européens utilisent cette extraction, basée sur les travaux de Symeonides et McRae (1977), comme procédure standardisée pour l'évaluation de la phytodisponibilité du Cd dans les sols. Déterminer si la présence d'un champignon mycorhizien modifie la quantité de Cd extractible à l'issue de la culture était un autre objectif de cette expérience.

D'autre part, la lixiviation des ETM dans les sols est un phénomène qui peut déboucher sur une contamination problématique des eaux souterraines, pourtant peu d'études prennent en compte cette potentielle fuite de polluants vers les horizons plus profonds des sols. La culture des plantes mycorhizées ou non dans des pots percés dans le fond vient de la volonté de récolter, à des temps donnés, les percolats d'eau et de mesurer leurs concentrations en Cd. Cela a permis de quantifier le Cd lixivié en présence ou non d'un champignon mycorhizien.

**Influence of *Glomus intraradices* on Cd partitioning in a pot experiment with *Medicago truncatula* in four contaminated soils**

Paul-Olivier Redon, Thierry Béguiristain and Corinne Leyval

LIMOS, Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols, UMR 7137, Nancy-University, CNRS ; Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, Cedex, France.

**Abstract**

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are known to have a beneficial effect on host plants growing in metal polluted soils. However, the potential contribution of AM fungi to cadmium (Cd) accumulation in plants is still uncertain and is rarely quantified in the context of phytoremediation. In a pot experiment, we quantified the partitioning of Cd in mycorrhizal (M) or not mycorrhizal (NM) *Medicago truncatula* in four soils as a function of Cd availability. AM inoculation with *G.intraradices* increased plant growth and metal accumulation in above-ground biomass, even though Cd concentrations in M plants were lower than in NM plants. AM inoculation also increased the quantity of available Cd and reduced Cd in leachates. Results were consistent and significant in the four tested soils and were not related to Cd availability. Such AM fungi could be a good tool for phytoextraction.

**Keywords** Arbuscular mycorrhiza, cadmium, *Glomus intraradices*, *Medicago truncatula*, heavy metal polluted soils, Cd availability, phytoextraction

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are known to have a beneficial effect on host plants growing in metal polluted soils (Khan, 2005). These symbiotic fungi increase shoot biomass (Heggo et al., 1990) by providing essential nutrients to plants (Requena, 2005) and by reducing metal stress (Rivera-Becceril et al., 2002). Arbuscular mycorrhizae were shown to transport Cd (Joner and Leyval, 1997) and to immobilize it in the root system (Joner and Leyval, 2001; Janoušková et al., 2006), which reduces the detrimental effect of metal on plant physiology. Therefore the use of mycorrhizal plants for land remediation has been proposed (Leyval and Joner, 2001). However, Cd uptake by plants as influenced by AM fungi depends on Cd speciation in soils (Kabata-Pendias, 2004) because soil conditions and type of pollution have substantial effects on Cd mobility (Bradl, 2004) and formation of mycorrhizae (Entry et al., 2002). Various effects of AM fungi under metal stress were also reported with different host plants, fungal isolates and substrates of culture. So, the potential contribution of AM fungi to Cd accumulation in plants is still uncertain and is rarely quantified in the context of phytoremediation. The aim of the present study was to quantify the partitioning of Cd in mycorrhizal (M) or non-mycorrhizal (NM) plants in four soils as a function of Cd availability.

Barrel medics (*Medicago truncatula* Gaertn. line J5) inoculated (M) or not (NM) with a metal-tolerant AM fungus (*Glomus intraradices*), isolated by Prof. H. Bothe (Köln University, Germany) from a metal contaminated soil and propagated by the Institut für Pflanzenkultur (Solkau, Germany), were grown for 45 days under controlled conditions in 1 kg pots containing different metal contaminated soils. These agricultural soils (Table 1), air-dried, ground and 4mm-sieved, differed mainly by their pH values. Two soils (Hist-6.1 and Hist-7.7) were historically contaminated by atmospheric deposition from smelters (which led to high concentrations of Zn, Pb and Cd) and two soils (Exp-5.3 and Exp-7.4) were experimentally contaminated with Cd ( $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ) at  $6 \text{ mg kg}^{-1}$  and aged for three weeks in order to obtain a range of four available Cd concentrations from 0.2 to  $1.7 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  (Table 1) estimated by  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1M extractions (Symeonides and Mc Rae, 1977). The four soils were sterilized by  $\gamma$ -irradiation (25 kGray) to eliminate indigenous AM fungi.

Prior to transplantation with pre-germinated medics (thinned to three seedlings per pot), soils were reinoculated with their indigenous microflora free of AM fungal spores (5 $\mu\text{m}$ -filtrated unsterilized soil suspension). During the 45 days of culture, plants were watered daily at 70% of the soil water holding capacity (WHC). Every two weeks, pots were watered at 100% of WHC and the volume of leachates collected was measured. Leachate aliquots were filtered at 45  $\mu\text{m}$  and Cd concentration was determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry. At the end of the culture, shoot and root fresh and dry weights were measured.

Mycorrhizal colonization of roots was estimated after Trypan Blue staining (Koske and Gemma, 1989) using Trouvelot et al. (1986) notation. Cd concentrations were measured by ICP-AES in roots and by graphite furnace atomic absorption spectrometry in shoots after digestion of 0.2 g of dry matter in HNO<sub>3</sub> 65% (4 mL) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (2 mL) at high temperature and pressure (170°C, 2 MPa) in a microwave digesting system (MARS 5). Concentrations of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> extractable Cd in soils at harvest were also measured.

*Table 1: Soil characteristics*

Soil name	Exp-7.4	Hist-7.7	Hist-6.1	Exp-5.3
Texture	Silty clay loam	Silt loam	Sandy loam	Silty clay loam
WRB Taxonomy	Luvisol	Luvisol	Luvisol	Luvisol
Type of pollution	Spiked with CdSO <sub>4</sub>	Historical pollution	Historical pollution	Spiked with CdSO <sub>4</sub>
pH	7.4	7.7	6.1	5.3
CEC (cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> )	14.9	15.3	5.4	12.2
C/N	9.4	13.5	13.3	8.2
Total CaCO <sub>3</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	8.62	7.78	2.47	1.58
P (Olsen) (mg kg <sup>-1</sup> )	117	148	132	108
Total Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	6.29	7.87	3.84	6.29
Total Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	148	627	489	114
Total Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	50	444	103	36
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> extractable Cd				
mg kg <sup>-1</sup>	0.21	0.77	0.64	1.70
% of total Cd	3.3	9.8	16.7	27.0

No mycorrhizal colonization was observed in NM treatments. Frequency of mycorrhizal colonized roots (Trouvelot et al., 1986) in M treatments differed significantly ( $p < 0.001$ ) between soils and was the highest in Exp-7.4 soil ( $79 \pm 11\%$ ), the lowest in Exp-5.3 ( $9 \pm 8\%$ ) and Hist-7.7 ( $11 \pm 14\%$ ) soils and was intermediate for Hist-6.1 soil ( $F = 42 \pm 29\%$ ). In all

soils, mycorrhizal inoculation significantly increased shoot biomass and decreased Cd concentrations in shoots (Fig. 1), as previously observed in many studies (Leyval and Joner, 2001). This decrease in Cd concentration due to AM inoculation ranged from 16 to 40% but did not depend on Cd availability in soil (Table 1).

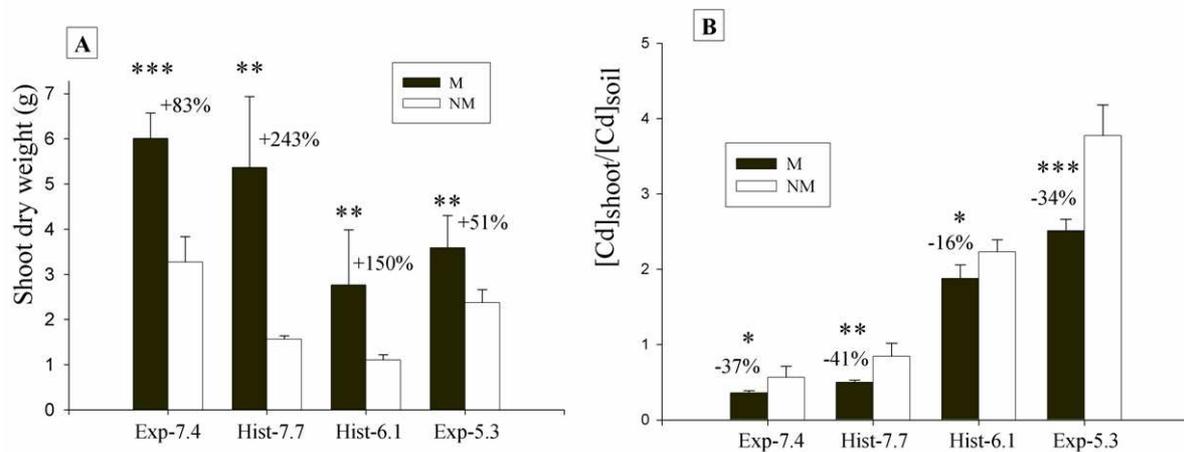


Fig. 1: (A) Shoot biomass (g) and (B) Ratio of Cd shoot concentration ( $\mu\text{g Cd g}^{-1}\text{dw}$ ) to Cd soil concentration ( $\mu\text{g Cd g}^{-1}\text{dry soil}$ ) of mycorrhizal (M) and non-mycorrhizal (NM) *M. truncatula* grown in the four studied soils. Values are means of five replicates. Errors bars are standard deviations. M and NM treatments in each soil were compared using Mann-Whitney test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . The differences between M and NM treatments are expressed as percentage of the NM treatment.

To take into account not only the concentrations in plant parts, but also the total Cd quantity mobilized from the soil, the partitioning of Cd in shoots, roots, leachates, and soil was expressed per pot (Table 2). The quantity of Cd removed from the soil represented 0.3 to 1.5 percents of total soil Cd. Cd partitioning was significantly affected by AM inoculation and by the soil. The quantity of plant accumulated Cd transferred to shoot of mycorrhizal plants in historically polluted soils was significantly 2-fold higher than in non-mycorrhizal plants. However, no significant differences between mycorrhizal and non-mycorrhizal plants were observed in spiked soils. This was due to the higher plant growth promotion by AM inoculation in historically polluted (150 to 240% increase) than in spiked (50 to 80%) soils (Fig. 1). The positive and protective role of the AM fungus was more important in the soils where several metal pollutants were present and thus where metal stress was higher. The quantity of Cd transferred to roots was significantly reduced by fungal inoculation (Table 2) in Hist-7.7 and Exp-6.1 soils.

Table 2: Cd partitioning ( $\mu\text{g}$  of Cd per pot) in mycorrhizal (M) and non-mycorrhizal (NM) *M. truncatula* pots, after 45 days of culture in the four studied soils.

Soil	Cd <sub>Soil</sub>	M/NM	Cd <sub>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></sub>	Cd <sub>Shoot</sub>	Cd <sub>Root</sub>	Cd <sub>Leachates</sub>
Exp-7.4	6353	M	210 $\pm$ 13 **	13.5 $\pm$ 1.3 ns	57.8 $\pm$ 15.1 ns	2.6 $\pm$ 1.2 *
		NM	175 $\pm$ 18	11.4 $\pm$ 1.9	67.3 $\pm$ 9.4	3.6 $\pm$ 0.8
Hist-7.7	8027	M	792 $\pm$ 29 *	21.6 $\pm$ 6.4 *	33.9 $\pm$ 14.1 *	7.7 $\pm$ 2.2 *
		NM	716 $\pm$ 37	10.4 $\pm$ 2.4	63.2 $\pm$ 19.5	11.2 $\pm$ 3.1
Hist-6.1	3921	M	709 $\pm$ 72 ns	19.3 $\pm$ 7.2 *	33.8 $\pm$ 19.0 ns	9.7 $\pm$ 1.1 ns
		NM	630 $\pm$ 17	9.5 $\pm$ 1.5	30.0 $\pm$ 4.3	10.6 $\pm$ 0.6
Exp-5.3	6353	M	1683 $\pm$ 57 ns	56.9 $\pm$ 12.7 ns	49.9 $\pm$ 6.8 ***	8.3 $\pm$ 2.1 *
		NM	1738 $\pm$ 137	56.6 $\pm$ 10.5	129.9 $\pm$ 31.5	11.5 $\pm$ 2.4
		Factor	F-ratios/Significance			
		Soil		83.36 ***	20.82 ***	58.78 ***
		Mycorrhiza		22.86 ***	28.57 ***	14.43 ***
		Soil x Mycorrhiza		4.67 **	11.68 ***	0.77 ns

Values are means of five replicates  $\pm$  standard deviation. Data were log-transformed when necessary to assess the effect of soil or mycorrhiza treatment by two-way ANOVA analysis. Differences between M and NM treatments were assessed using Student-Newman-Keuls method. ns = not significantly different, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

M and NM treatments for Cd<sub>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></sub> were compared using Mann-Whitney test.

For pollution monitoring, in the context of phytoremediation or food/water quality assessment, the amounts of Cd transferred to plant shoots and leachates should be considered, but data on leaching water are scarce and, to our knowledge, mycorrhizal contribution to it was never shown. The ANOVA analysis (Table 2) showed that the total amount of Cd transferred to leachates (sum of four leachates collected every two weeks from the beginning to the end of the culture) was significantly reduced by mycorrhizal inoculation, up to 30 % for three out four soils. The Soil x Mycorrhiza interaction was significant for Cd in shoots and roots but not in leachates, suggesting that the AM effect on Cd leachates was independent of the soil. This could be due to the metal-binding capacity of the AM mycelium (Joner et al., 2000; Audet and Charest, 2007). The pool of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> extractable Cd in soil at harvest was significantly higher in M than in NM treatments in Exp-7.4 and Hist-7.7 soils. Such increase could be due to an indirect fungal effect via the largest plant biomass in the soils with the highest pH values.

*G.intraradices* effect on Cd partitioning was consistent and significant in the four soils and was not related to Cd availability within the range of Cd concentrations tested. It promoted vegetation growth, leading to a higher accumulation in aboveground biomass of plant accumulated Cd even though the Cd concentration in plants was lower than in non mycorrhizal plants. Furthermore, the fungal inoculation increased Cd availability and reduced Cd in leachates. Such effects of AM fungi could therefore be useful in phytoremediation of metal polluted soils, especially for phytoextraction. Indeed, the use of mycorrhizal plants could minimize some of the limitations of the phytoextraction efficiency (Van Nevel et al., 2007) such as the decrease of available metal concentration after successive croppings, the lower biomass produced due to nutrient depletion and the negative effects of polymetallicity on plant productivity.

### **Acknowledgments**

Authors are grateful to Vivienne Gianinazzi-Pearson (INRA Dijon, France) for providing seeds of *Medicago truncatula*, and acknowledge the research program TOX-NUC for funding.

## Principaux résultats

Dans les quatre sols étudiés, le champignon MA inoculé a fortement augmenté la biomasse aérienne des plantes et diminué leur concentration en Cd. Ce champignon a donc eu un effet bénéfique sur la croissance de la plante quel que soit le sol étudié, même si les éléments essentiels, en particulier le phosphore, n'étaient pas limitants. Les champignons mycorhiziens sont connus pour améliorer la nutrition des plantes en éléments limitants et ainsi augmenter la concentration de ces éléments dans la plante. Or, les concentrations en P mesurées dans la plante n'ont pas été augmentées par la colonisation mycorhizienne (Annexe 2), sauf dans le sol Exp-7.4 où la disponibilité était la plus faible. La baisse de la concentration en métaux et en quelques autres éléments majeurs serait en partie due à un « effet dilution » dans la plante, étant donné le fort effet positif de l'inoculation sur la biomasse végétale. La contribution du champignon MA pour les différents paramètres mesurés (biomasse, concentrations en Cd), calculée par la formule  $[100 \times (\text{plantes mycorhizées} - \text{plantes non mycorhizées}) / (\text{plantes non mycorhizées})]$ , montre que l'intensité de l'effet mycorhizien varie selon le sol. Un meilleur accroissement de la biomasse aérienne a en effet été observé sur les deux sols pollués historiquement et contenant donc de fortes concentrations en Pb et Zn, en plus du Cd. La présence d'autres ETM auraient eu un effet négatif supplémentaire sur le développement de la plante en absence du champignon puisque les biomasses des plantes non mycorhizées étaient les plus faibles sur ces deux sols, d'où un effet mycorhizien plus marqué. Par contre, cet effet de la mycorhization n'est pas dépendant de la disponibilité du Cd, il est donc plutôt influencé par le type de pollution et par le mélange de plusieurs ETM.

Lorsque l'on calcule la quantité totale de Cd transférée à la plante, en multipliant la biomasse végétale par la concentration en Cd, on s'aperçoit que la présence du champignon peut augmenter la masse de métal accumulée dans la plante. Même si la concentration en Cd dans les parties aériennes des plantes mycorhizées était plus faible que dans celles des plantes non mycorhizées, la quantité totale de Cd transférée aux parties aériennes a été doublée en présence du champignon lors de la culture sur les deux sols historiquement contaminés grâce à une plus forte augmentation de la biomasse foliaire. Une contribution si importante du champignon MA sur le bilan de Cd exporté dans la plante, mérite une attention particulière pour le calcul des flux d'ETM en modélisation et pour des études de phytoextraction, même si

la quantité de Cd transférée à la plante reste faible (0,3 à 1,5%) par rapport à la quantité initiale présente dans les sols.

L'inoculation a eu aussi un effet sur la mobilité du Cd dans le sol. D'une part, la quantité totale de Cd lixiviée, en faisant la somme de quatre lixiviations, au cours de la période de culture était significativement plus faible (~ -30%) dans les traitements mycorhizés (M) que dans les non mycorhizés (NM), pour trois sols sur quatre. D'autre part, la quantité de Cd extractible au  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  à la fin de la culture était plus importante en présence qu'en absence du champignon inoculé, uniquement pour les deux sols à  $\text{pH} > 7$ , bien que les pH des sols rhizosphériques et des percolats ne soient pas différents entre les traitements M et NM (Annexe 3). Une plus grande extractibilité du Cd n'implique donc pas forcément une plus grande lixiviation car le cadmium rendu plus disponible peut être immobilisé par la composante biologique de la rhizosphère, dont les racines et mycélium fongique. Néanmoins, l'expérience ne permet pas de déterminer si le mycélium a une action directe sur la mobilité de Cd dans le sol ou si c'est un effet de l'inoculation dû à l'augmentation de la biomasse de la plante. Quoiqu'il en soit, la colonisation d'un sol par un champignon mycorhizien peut permettre de réduire la lixiviation des métaux.

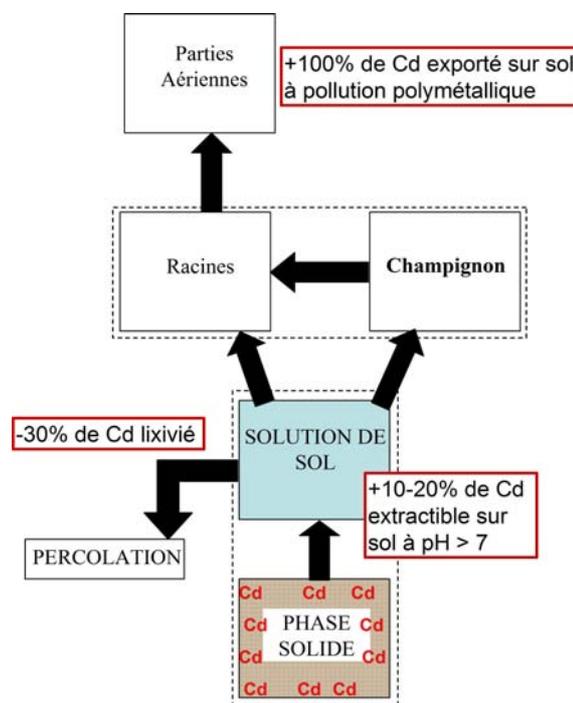


Figure 12 : Schéma récapitulatif de l'expérience 1 : effets de l'inoculation mycorhizienne sur le transfert de Cd par rapport à un système non mycorhizé. Les flux de Cd sont représentés par les flèches noires.

## II. Expérience 2 : Effets de différents isolats de champignons MA sur le transfert de Cd et de Zn à la plante.

### Introduction/Objectif de l'expérience

L'expérience précédente a permis de mettre en évidence l'augmentation de la croissance de la luzerne et la diminution de la concentration en Cd dans la plante par un isolat de *Glomus intraradices*. Pour deux des sols étudiés, l'inoculation par ce champignon a conduit à multiplier par deux la quantité de Cd exportée dans les parties aériennes de la plante. Tous les champignons MA ont-ils ces mêmes capacités? Des études précédentes laissent à penser que non. Les différentes espèces de Glomeromycètes présentent en effet une diversité fonctionnelle (Drew et al., 2003 ; 2006) qui ne donne pas la même capacité à tous les champignons MA d'aller explorer le sol à la périphérie des racines et de prélever les différents éléments nutritionnels. Ces champignons semblent aussi avoir une forte plasticité phénotypique car des isolats tolérants ou non tolérants aux polluants métalliques ont été identifiés au sein de mêmes espèces (Weissenhorn et al., 1993). De plus, l'isolat de *G. intraradices* utilisé a montré un effet très marqué sur la biomasse de la plante, qui peut masquer un éventuel effet de sorption et d'accumulation des métaux précédemment montré pour d'autres isolats

Dans le but de comparer l'effet sur le bilan de Cd de différents isolats de champignons MA, le même type de culture que précédemment a été réalisé en faisant varier cette fois le champignon inoculé. Le sol étudié ici était le sol présentant une pollution multimétallique Hist-7.7 car, dans la première expérience, le meilleur effet mycorhizien a été observé sur ce sol. Sa concentration relativement élevée en zinc donnait aussi la possibilité de suivre le transfert de cet élément en parallèle à celui du cadmium. Cd et Zn sont en effet souvent présents ensemble en fortes concentrations dans les sols contaminés car ils sont généralement produits par la même source de pollution et ont des comportements chimiques dans les sols et les plantes proches. La différence majeure entre ces deux métaux est que Zn est un oligo-élément alors que Cd est un élément non-essentiel.

Les souches de champignon MA utilisées ont été choisies en fonction de leur origine et des connaissances sur leur tolérance au cadmium d'après des travaux antérieurs, pour pouvoir comparer des isolats de sols contaminés ou non. Ces champignons appartiennent à deux

espèces différentes (*Glomus intraradices* et *Glomus mosseae*), en plus d'une autre espèce non identifiée (*Glomus* sp.). Plusieurs études ont mis en évidence un meilleur effet protecteur pour la plante de la part de champignons MA tolérants aux métaux, isolés de sols contaminés, par rapport à des champignons MA non tolérants (Gildon et Tinker, 1983 ; Hildebrandt et al., 1999). Les isolats fongiques tolérants aux métaux seraient ainsi les plus aptes à améliorer la phytoremédiation, par exemple pour favoriser le développement d'un couvert végétal plus dense sur des sites très pollués (Orlowska et al., 2005). Notre deuxième expérience visait donc à déterminer si des champignons MA isolés de sols contaminés ont un effet plus important sur les bilans de Cd et de Zn que des champignons MA ne provenant pas de sols contaminés.

Par ailleurs, la durée de la culture est un autre paramètre dont dépend le bilan de Cd (Giasson et al., 2006). La culture de plantes mycorhizées par *G. intraradices* (G.i. n°1) et de plantes non mycorhizées a ainsi été menée sur deux temps (30 et 45 jours) pour déterminer si l'effet mycorhizien varie en fonction du moment où la récolte est effectuée.

Mycorrhiza 19 : 187–195 (2009)

**Differential effects of AM fungal isolates on *Medicago truncatula* growth and metal uptake in a multimetallic (Cd, Zn, Pb) contaminated agricultural soil**

Paul-Olivier Redon, Thierry Béguiristain and Corinne Leyval

LIMOS, Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols, Nancy-University, CNRS ; Faculté des Sciences, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex, France.

**Abstract**

Toxic metal accumulation in soils of agricultural interest is a serious problem needing more attention and investigations on soil-plant metal transfer must be pursued to better understand the processes involved in metal uptake. Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are known to influence metal transfer in plants by increasing plant biomass and reducing metal toxicity to plants, even if diverging results were reported. The effects of five AM fungi isolated from metal contaminated or non-contaminated soils on metal (Cd, Zn) uptake by plant and transfer to leachates was assessed with *Medicago truncatula* grown in a multimetallic contaminated agricultural soil. Fungi isolated from metal contaminated soils were more effective to reduce shoot Cd concentration. Metal uptake capacity differed between AM fungi and depended on the origin of the isolate. Not only fungal tolerance and ability to reduce metal concentrations in plant but also interactions with rhizobacteria affected heavy metal transfer and plant growth. Indeed, thanks to association with nodulating rhizobacteria, one *G. intraradices* inoculum increased particularly plant biomass which allowed exporting 2-fold more Cd and Zn in shoots as compared to non mycorrhizal treatment. Cd concentrations in leachates were variable among fungal treatments but can be significantly influenced by AM inoculation. The differential strategies of AM fungal colonization in metal stress conditions are also discussed.

**Keywords** Cadmium, Zinc, *Glomus*, *Medicago truncatula*, Metal transfer

## Introduction

Soil pollution by heavy metals disseminated from human activities is a major world concern because metals are very toxic and remain persistent in soils. Metals are not biodegradable and tend to accumulate in soils and organisms where anthropogenic impact is intense. Considered as a non-essential metal element, cadmium (Cd) was widely studied because of its acute toxicity. Even at low concentrations in the environment, Cd can accumulate in biological organisms and result in severe troubles (Wren et al., 1995). To prevent such risks, it is necessary to quantify Cd transfer to plants. Numerous studies investigated soil-plant metal transfer to find the most reliable methods for the prediction of heavy metal bioavailability and to understand the processes involved in the uptake of these toxic elements. In polluted soils, Cd is rarely present alone and is often associated to other heavy metals such as high levels of zinc (Zn). Cd and Zn behaviour in plants and soils are linked (Welch et al., 1999; Nan et al., 2002; Bradl, 2004) but, as an essential trace metal, Zn is of second concern because of its lower toxicity. Many soil parameters influence metal transfer to plants. The most important variables which control metal availability are: pH, redox potential, texture, organic matter, mineral composition, temperature and water regime (Kabata-Pendias, 2004). Besides these abiotic factors, the biological components of soils (plant, microorganisms) play also a major role on metal fate. In particular, soil microorganisms affect root morphology, plant physiology and metal fractionation (Tao et al., 2005). The strong interactions of rhizospheric bacteria and fungi with roots thus modify the capacity of metal pollutants to be absorbed by plants. Among soil microorganisms, arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are widely studied because of their ability to improve plant fitness under stress conditions (Gildon and Tinker, 1983; Leyval and Joner, 2001; Khan, 2005). Colonizing most of the terrestrial plants, these ubiquitous symbiotic fungi provide essential nutrients to plants, such as low available P (Requena, 2005), which allows increasing shoot biomass (Heggo et al., 1990). AM fungi increase nutrient acquisition by exploring a vast soil volume (Harley and Smith, 1983) and can be beneficial to host plant growing in unfavourable soil conditions as in nutrient deficient soils or in polluted areas. In heavy metal contaminated soils, AM fungi can also improve the growth of host plant by reducing metal stress (Rivera-Becceril et al., 2002) in addition to an enhancement of nutrient acquisition. The alleviation of stress may be partly due to the immobilization of heavy metals in the mycorrhizosphere and to the decrease of metal concentration in mycorrhizal plants (Kapoor and Bhatnagar, 2007). AM fungi are able to transport non-essential elements as Cd (Joner & Leyval, 1997; Hutchinson et

al., 2004) and to sequester them in roots (Galli et al., 1994; Janoušková et al., 2006). However, AM fungi have variable effects on metal uptake and growth of host plant (Hildebrandt et al., 2007) as in some cases AM inoculation did not increase plant biomass (Killham and Firestone, 1983; Weissenhorn and Leyval, 1995). Many factors contribute to the divergences of AM fungal effects, among them the nature of the plant-fungus association i.e. the plant and fungal genotypes. Metal tolerant AM fungi isolated from contaminated sites are thought to have a better protecting effect towards plants than isolates from non-contaminated soils (Gildon and Tinker, 1983; Hildebrandt et al., 1999). However, metal tolerance of AM fungi is not easy to assess since they cannot be grown without the plant. Their tolerance to heavy metals has thus been tested regarding spore germination (Weissenhorn et al., 1993) and root colonization (Rydlova and Vosatka, 2003), or considered for the AM isolates collected from contaminated soils without checking their effective tolerance.

In a previous work, we pointed out the effect of an AM fungus isolated from a heavy metal contaminated soil on Cd transfer to plants growing in soils with different availabilities and different kinds of pollution (Redon et al., 2008). AM inoculation with *Glomus intraradices* increased *Medicago truncatula* growth, decreased Cd concentration in plant shoots and Cd content in leachates (-30%), although the total metal content in shoots was increased twofold. The objective of the present study was to compare the effects of five *Glomus* strains isolated from contaminated and non-contaminated soils on Cd and Zn uptake by *M. truncatula* and on metal concentration in leachates in a multimetallic contaminated agricultural soil.

## Materials and methods

### Soil and inoculum

The agricultural soil was sampled near a former smelter (MetalEurope, North of France). It contained high levels of heavy metals (Pb, Zn and Cd) due to historical atmospheric deposition from the smelter. This silty-loamy soil, ground and 4 mm-sieved, had the following characteristics:  $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$  7.7;  $15.3 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1} \text{ CEC}_{\text{cobaltihexammine}}$ ;  $16.6 \text{ g kg}^{-1}$  organic C;  $1.2 \text{ g kg}^{-1}$  total N;  $148 \text{ mg kg}^{-1} \text{ P}_{\text{Olsen}}$ ;  $7.87 \text{ mg kg}^{-1}$  total Cd ( $0.8 \text{ mg kg}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$  extractable Cd);  $627 \text{ mg kg}^{-1}$  total Zn;  $444 \text{ mg kg}^{-1}$  total Pb. Metal pollutants had a relatively low availability because of a slightly alkaline pH and an aged pollution. The soil was sterilised by  $\gamma$ -irradiation at 25 kGray to eliminate all indigenous fungi and 10 mL of a 5- $\mu\text{m}$  filtrated

unsterilised soil suspension (15 g soil in 150 mL NaCl 0.8%) was added to re-inoculate the indigenous microflora of the soil free of AM fungal spores.

Table 1: Isolates of arbuscular mycorrhizal fungi used in the study. It is mentioned whether the fungi were isolated for the first time in a metal polluted or not polluted soil.

Treatment name	Species	N° BEG	Origin	Inoculum source	Reference
Gi n°1	<i>Glomus intraradices</i>	none	Heavy-metal rich soil ("Breinigerberg" soil)	Institut für Pflanzenkultur (Solkau, Germany)	Hildebrandt et al., 1999
Gi n°2	<i>Glomus intraradices</i>	BEG 141	Not polluted soil	V. Gianinazzi-Pearson	Rivera-Becerril et al., 2002
GmP2	<i>Glomus mosseae</i> P2	BEG 69	Metal polluted soil (atmospheric deposition from smelter)	Leek culture on the original soil at LIMOS	Weissenhorn et al., 1993
Gm	<i>Glomus mosseae</i>	BEG 12	Not polluted soil	Leek culture on non contaminated expanded clay at LIMOS	Weissenhorn et al., 1993
Gsp	<i>Glomus</i> sp.	none	Soil amended with slightly metal contaminated sludge	Leek culture on non contaminated expanded clay at LIMOS	Joner et al., 2000

Different mycorrhizal treatments were performed (three replicates per treatment) with five AM fungi and a non-mycorrhizal control. The origins of the fungal isolates are shown in Table 1. Two AM fungi were isolated from heavy metal contaminated soils, one from a soil with a low Cd content due to sludge amendment, and two from non contaminated soils. Metal tolerance of all the isolates was not quantified as such. However, except *Glomus* sp., the isolates were shown to be able to colonise plants growing in contaminated soil or substrates with Cd concentrations in the same order of magnitude or higher as in the present study (Redon et al. (2008) for *G. intraradices* n°1; Rivera-Becerril et al. (2002) for *G. intraradices* n°2; Weissenhorn and Leyval (1995) for *G. mosseae* P2 and BEG 12). Using spore germination tests, *G. mosseae* P2 (BEG 69) was shown to be more tolerant to Cd than *G. mosseae* BEG 12 (Weissenhorn et al., 1993) : the mean effective Cd concentration at which

50% of the spores failed to germinate (EC50) was  $0.8 \text{ mg L}^{-1}$  for *G. mosseae* BEG 12 and  $7 \text{ mg L}^{-1}$  for *G. mosseae* P2. *G. mosseae* P2 was the only isolate of the study propagated in a metal-containing medium. Both *Glomus intraradices* isolates were inoculated using 100 g of inoculum substrate added to 900 g of soil, whilst the *G. mosseae* and *Glomus* sp. were added as 200 spores per pot. Non-mycorrhizal control, *G. mosseae* and *Glomus* sp. treatments also received 100 g of autoclaved and mixed G.i. n°1 (35%) and n°2 (65%) inoculums. Mycorrhizal and non-mycorrhizal plants were grown for 45 days. Three additional non-mycorrhizal (NM) and *G. intraradices* n°1 inoculated pots were added to collect data at 30 days of culture.

### Pot Experiment

Seeds of barrel medics (*Medicago truncatula* Gaertn. line J5) were surface-sterilised (Ethanol 50% for 5 min, Calcium hypochlorite 20% for 30 min, Chloramine T 2% for 10 min, Streptomycin 2% + one drop of TWEEN 80 for 10 min, seeds were rinsed two times with distilled water after each bath) before germination on autoclaved vermiculite. Five 5-days seedlings were planted per pot and grown under controlled conditions (16 h photoperiod,  $22^{\circ}\text{C}/18^{\circ}\text{C}$  day/night,  $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 70% relative humidity). The culture was thinned at three seedlings per pot after one week. Plants were watered daily with distilled water to maintain 70% of water holding capacity (WHC). Every week after two weeks of culture, plants were watered with a P-deficient nutritive solution (1 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 1 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; 0.75 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 12.5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 2.5  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0.3  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.05  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.2  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.2  $\mu\text{M}$   $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 20  $\mu\text{M}$  Fe-EDTA) instead of distilled water. Every 15 days, abundant rainfall was simulated by watering pots at 100% of WHC and the volume of leachates was measured. An aliquot of leaching water was filtered at  $45 \mu\text{m}$  where pH was measured and metal concentrations were determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry.

### Harvest and analyses

After 30 days or 45 days of culture, shoots were cut and roots were separated from the soil with forceps and by sieving. Roots were rinsed with tap water and then rinsed with ultra pure water. Soils were oven dried at  $60^{\circ}\text{C}$ . Roots were cut into 1 cm long segments.

Mycorrhizal colonisation of roots (0.7 g of fresh clean roots) was determined by Trypan blue staining as described by Koske and Gemma (1989) and notation was performed using Trouvelot et al. (1986) method. Roots and shoots were oven dried at 60°C and ground in liquid nitrogen. Root and shoot dry matter was weighed. Dry plant samples (0.2 g) were digested in HNO<sub>3</sub> 65% (4 mL) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (2 mL) at high temperature and pressure (170°C, 20 Bars) using special Teflon® pressure vessels in a microwave digesting system (MARS 5). The digests were filtered and made up to 50 mL with ultra pure water. Concentrations of P, Pb, Zn and Cd were measured by ICP-AES or graphite furnace atomic absorption spectrometry for Cd concentration in shoots.

Extraradical hyphae were extracted from 1 g of rhizospheric soil using the aqueous membrane filtration technique (Jakobsen et al., 1992; Boddington et al., 1999) and hyphal length was estimated after Trypan blue staining by the grid-line intersect method (Jakobsen et al., 1992) over 25 fields of view at 100x magnification. The hyphal background found in non mycorrhizal pots was subtracted from the values measured in the different mycorrhizal treatments. Presence and approximate number of root nodules were counted at harvest. Presence of nodulating rhizobacteria in AM inoculated or not inoculated roots at harvest and in Gi n°1 inoculum was also assessed by PCR amplification of nodC gene using nodCF and nodCI primers as described by Laguerre et al. (2001).

### Statistical analysis

Analyses of variance between AM treatments were performed with SigmaStat 3.11, using the Tukey's test for mean comparison.

## Results

Mycorrhiza frequency (F%) and intensity of mycorrhizal colonisation (M%) were very high in pots inoculated with both *G. intraradices*, much lower in pots inoculated with *G. mosseae* P2 and *Glomus* sp., and very low in *G. mosseae* BEG 12 (Table 2). Non inoculated plants were not mycorrhizal. The growth of external mycelia in soil was consistent with root colonisation, as hyphal length increased with the mycorrhiza frequency (Table 2). Plant biomass was differently influenced by the fungal strains (Figure 1).

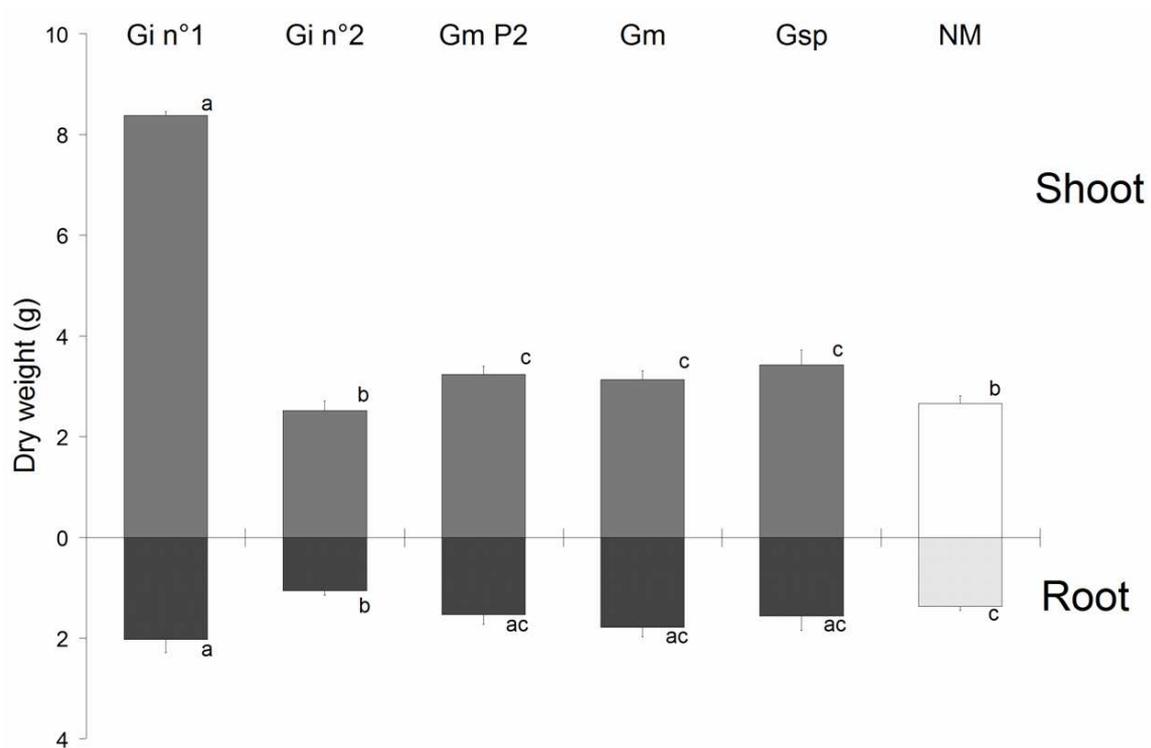


Figure 1: Shoot and root dry weights (g) of 45-days old *Medicago truncatula* inoculated with different AM fungal isolates (Gi: *Glomus intraradices*; Gm: *Glomus mosseae*; Gsp: *Glomus sp.*) or not inoculated (NM). Values are means of three replicates. Error bars are standard deviations. Bars with the same letter are not significantly different at the 5% level according to the Tukey's test.

After 45 days of culture, *G. intraradices* n°1 strongly increased shoot (+216%) and root (+48%) biomass as compared to NM treatment. Both *Glomus mosseae* and *Glomus sp.* increased shoot biomass to a lesser extent (about +20%). On the contrary, *G. intraradices* n°2 did not change shoot biomass and decreased root dry weight (-23%). Numerous nodules in pots inoculated with *G. intraradices* n°1 were observed, whilst very few nodules were observed with the other fungi and in NM treatments (Table 2). Nodulating rhizobacteria were detected in roots, AM inoculated or not, where nodules were observed but not in Gi n°1 inoculum (data not shown). The different inoculations also showed various effects on P and metal plant contents (Table 3). Strains isolated from metal polluted sites (*G. intraradices* n°1 and *G. mosseae* P2) significantly ( $P < 0.05$ ) decreased P and Cd and tended to decrease Zn shoot concentrations as compared to NM and other mycorrhizal treatments (Table 3a). Pb contents in shoots were below detection limit. Both isolates of *G. intraradices* had opposite effects on P root concentration (Table 3b). It was significantly decreased in Gi n°1 pots whilst it was significantly increased in Gi n°2 pots as compared to NM pots. *G. intraradices* n°2

tended to reduce non-essential metals (Cd and Pb) absorption by roots but significantly increased Zn concentration in shoots. *G. mosseae* BEG 12 and *Glomus* sp. had no significant effects on measured elements in plant.

*Table 2: Mycorrhiza frequency (F%), intensity of colonization (M%), hyphal length (m g<sup>-1</sup>) and number of nodules per pot at harvest (after 30 or 45 days) in the different fungal inoculation treatments. Values are means of three replicates ± standard deviation. ND : not determined.*

Treatment name	Days of culture at harvest	F%	M%	Hyphal length (m g <sup>-1</sup> )	Number of nodules
Gi n°1	45	90 ± 0	44 ± 4	0.82 ± 0.39	117 ± 15
Gi n°2	45	100 ± 0	63 ± 6	0.80 ± 0.57	0 ± 0
GmP2	45	19 ± 5	3 ± 2	0.28 ± 0.25	0 ± 0
Gm	45	8 ± 13	1 ± 2	0.11 ± 0.16	0.3 ± 0.6
Gsp	45	13 ± 18	3 ± 4	0.32 ± 0.11	0 ± 0
NM	45	0	0	0	0.3 ± 0.6
Gi n°1	30	42 ± 5	12 ± 1	ND	90 ± 10
NM	30	0	0	ND	5 ± 8

The total Zn plant content was about 10-fold higher than the total Cd plant content. The total Cd and Zn transferred to shoots and roots in the different fungal treatments had almost the same pattern; therefore, results are shown for Cd only (Figure 2). *G. intraradices* n°1 increased by 2-2.5 times the total Cd (Figure 2) and Zn (data not shown) contents in shoots and roots. *G. intraradices* n°2 decreased total Cd and Zn root contents, whilst the other isolates did not modify the metal content in plant as compared to NM treatment, except in Gm treatment where the total Cd root content was increased. *G. intraradices* n°1 and NM treatments were compared 30 and 45 days after planting. 45-days old mycorrhizal medics (8.37 g shoot dw) were 4-fold bigger than 30-days old mycorrhizal medics (2.07 g shoot dw) whilst non-mycorrhizal medics were 1.6-fold bigger after 45 days (2.65 g shoot dw) than after 30 days (1.6 g shoot dw). After 30 days, decreased shoot metal concentrations (-23% Cd and -20% Zn) were observed in mycorrhizal pots as compared to NM pots but the total Cd (and Zn) shoot and root contents were not significantly different between Gi n°1 and NM (Figure 2). Above-ground parts of Gi n°1 inoculated medics accumulated 4.2-fold less Cd after 30 days than after 45 days.

Table 3: Concentrations of metals (Cd, Zn, Pb) and phosphorus in shoots (a) and roots (b) of 45-days old *Medicago truncatula* inoculated with different AM fungal isolates or not inoculated (NM). Values are means of three replicates  $\pm$  standard deviation.

<d.l. = under detection limit ( $< 2 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Means in the same column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level according to the Tukey's test.

(a)

Inoculated fungus	Cd ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	P ( $\text{mg g}^{-1}$ )
<i>Glomus intraradices</i> n°1	1.99 $\pm$ 0.18 a	36.7 $\pm$ 1.9 b	<d.l.	2.75 $\pm$ 0.29 a
<i>Glomus intraradices</i> n°2	3.08 $\pm$ 0.22 bc	57.9 $\pm$ 1.9 a	<d.l.	3.36 $\pm$ 0.07 bd
<i>Glomus mosseae</i> P2	2.55 $\pm$ 0.23 b	38.8 $\pm$ 1.3 b	<d.l.	3.12 $\pm$ 0.18 ad
<i>Glomus mosseae</i>	3.14 $\pm$ 0.23 c	48.8 $\pm$ 4.3 c	<d.l.	3.64 $\pm$ 0.20 bc
<i>Glomus</i> sp.	2.95 $\pm$ 0.20 bc	43.3 $\pm$ 1.4 c	<d.l.	3.60 $\pm$ 0.06 c
NM	3.29 $\pm$ 0.39 c	45.8 $\pm$ 7.1 bc	<d.l.	3.78 $\pm$ 0.36 bc

(b)

Inoculated fungus	Cd ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	P ( $\text{mg g}^{-1}$ )
<i>Glomus intraradices</i> n°1	50.4 $\pm$ 1.9 a	486 $\pm$ 26 a	116 $\pm$ 22 a	3.24 $\pm$ 0.16 a
<i>Glomus intraradices</i> n°2	34.6 $\pm$ 1.4 b	363 $\pm$ 21 b	53 $\pm$ 6 b	8.72 $\pm$ 0.09 b
<i>Glomus mosseae</i> P2	42.5 $\pm$ 3.8 c	322 $\pm$ 20 b	75 $\pm$ 9 c	4.67 $\pm$ 0.64 c
<i>Glomus mosseae</i>	44.6 $\pm$ 6.4 abc	327 $\pm$ 23 b	121 $\pm$ 31 ac	5.40 $\pm$ 0.48 c
<i>Glomus</i> sp.	37.5 $\pm$ 2.2 bc	320 $\pm$ 43 b	123 $\pm$ 47 abc	5.26 $\pm$ 0.38 c
NM	43.8 $\pm$ 6.6 abc	323 $\pm$ 45 b	153 $\pm$ 69 abc	5.50 $\pm$ 0.17 c

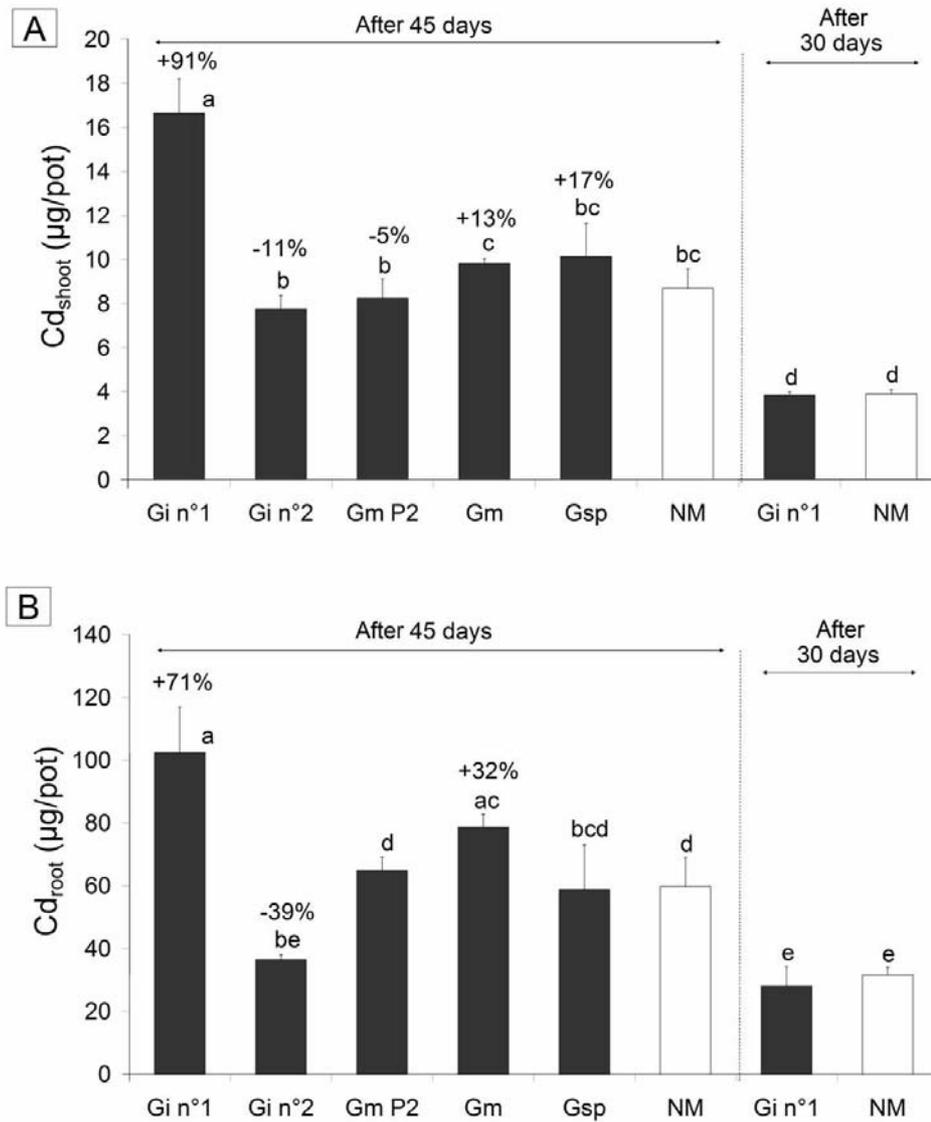


Figure 2: Total Cd content ( $\mu\text{g}$  per pot) in shoots ( $Cd_{shoot}$ ) (a) and roots ( $Cd_{root}$ ) (b) of *Medicago truncatula* inoculated with different AM fungal isolates (Gi: *Glomus intraradices*; Gm: *Glomus mosseae*; Gsp: *Glomus sp.*) or not inoculated (NM) after 45 days or 30 days. Values are means of three replicates. Error bars are standard deviations. Bars with the same letter are not significantly different at the 5% level according to the Tukey's test.

Table 4: pH (a) and Cd concentrations (b) of leachates after 11, 24 and 39 days of culture. Values are means of three replicates  $\pm$  standard deviation. Means followed by the same letter are not significantly different at the 5% level according to the Tukey's test. Data were log-transformed for the analysis of variance of Cd concentrations in leachates. n.s. = not significantly different; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

(a)	pH <sub>leachates</sub>		
	11 d	24 d	39 d
<i>Glomus intraradices</i> n°1	7.65 $\pm$ 0.19 a	7.54 $\pm$ 0.07 ab	7.08 $\pm$ 0.15 c
<i>Glomus intraradices</i> n°2	7.36 $\pm$ 0.03 b	7.47 $\pm$ 0.04 ab	7.65 $\pm$ 0.09 a
<i>Glomus mosseae</i> P2	7.39 $\pm$ 0.07 b	7.43 $\pm$ 0.07 ab	7.34 $\pm$ 0.06 b
<i>Glomus mosseae</i>	7.48 $\pm$ 0.09 ab	7.50 $\pm$ 0.04 ab	7.41 $\pm$ 0.07 ab
<i>Glomus</i> sp.	7.51 $\pm$ 0.06 ab	7.53 $\pm$ 0.02 ab	7.54 $\pm$ 0.03 ab
NM	7.56 $\pm$ 0.08 ab	7.46 $\pm$ 0.04 ab	7.49 $\pm$ 0.11 ab
Analysis of variance			
	F-ratios/Significance		
Fungus	3.50 *		
Days of culture	4.42 *		
Fungus x Days of culture	9.24 ***		
(b)	[Cd] <sub>leachates</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		
	11 d	24 d	39 d
<i>Glomus intraradices</i> n°1	7.6 $\pm$ 2.3 ab	11.3 $\pm$ 2.0 abe	19.2 $\pm$ 8.4 de
<i>Glomus intraradices</i> n°2	8.1 $\pm$ 3.2 ab	11.3 $\pm$ 3.5 abe	29.6 $\pm$ 11.4 cd
<i>Glomus mosseae</i> P2	6.2 $\pm$ 1.4 ab	10.2 $\pm$ 2.9 abe	36.5 $\pm$ 2.9 cd
<i>Glomus mosseae</i>	7.4 $\pm$ 0.8 ab	12.3 $\pm$ 1.7 be	45.8 $\pm$ 13.2 c
<i>Glomus</i> sp.	8.9 $\pm$ 1.9 ab	11.7 $\pm$ 1.6 abe	54.5 $\pm$ 3.8 c
NM	5.7 $\pm$ 2.2 a	11.2 $\pm$ 1.4 abe	31.0 $\pm$ 5.5 cd
Analysis of variance			
	F-ratios/Significance		
Fungus	3.69 **		
Days of culture	166.89 ***		
Fungus x Days of culture	2.09 n.s.		

Whilst pHs of leachates were not different after 11 days and 24 days of culture, they were variable between fungal treatments after 39 days (Table 4). At this time of growth, *G. intraradices* n°1 significantly decreased pH of leachates as compared to other fungi and NM pots. Cd concentrations in leachates were higher after 39 days than after 11 and 24 days. Cd concentrations after 39 days of culture ranged from 19.2 to 54.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  and were significantly higher with *Glomus* sp. and *G. mosseae* than with both *G. intraradices* isolates and NM treatment. Zn concentrations in leachates were about 10-fold higher than Cd concentrations but were not presented because they were of the same order of magnitude as additional Zn brought by the nutrient solution.

## Discussion

Many agricultural soils are contaminated by heavy metals and such situations need careful attention. Whilst the studied soil was not extremely contaminated (as compared to industrial waste lands), the  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  extractable Cd concentration was higher than the German limitation of 0.1  $\text{mg kg}^{-1}$  (BodSchV, 1999) and Cd concentrations measured in shoots (a minimum of 0.3  $\text{mg kg}^{-1}$  fresh weight was observed in Gi n°1 treatment) were above the maximum levels in vegetables and cereals (0.05 to 0.2  $\text{mg kg}^{-1}$  fresh weight depending on the category of foodstuff) defined by the European Commission n°466/2001 for human consumption of foodstuffs. Zn and Pb total soil concentrations are above the precaution values of metals given by the German federal soil protection (BodSchV, 1999) and Zn root concentration in *Medicago truncatula* was in the range of chronic toxicity (NOEC: 300  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) reported for *Medicago sativa* (Boawn and Rasmussen, 1971). Furthermore, in a previous study, the growth of non-mycorrhizal medic was shown to be lower in this soil than in artificially Cd-contaminated soils with the same concentration range (Redon et al., 2008), suggesting a relative increased toxicity due to the multipollution with Cd, Zn and Pb in the soil.

Within these soil conditions, differential behaviour of AM isolates in response to abiotic stress were observed, leading to different impact on plant tolerance to metal contamination. Growth of the model legume *Medicago truncatula* was improved by four of the five inoculated fungi although P was not limiting as illustrated by no higher P concentrations in mycorrhizal plants. Indeed, agricultural soils are often overfertilised, especially in the case of soils with high levels of heavy metals where farmers increase pH to reduce metal bioavailability. However, origin and stress adaptation of fungi may have played a key role on

metal transfer and root colonisation by fungi. On one hand, mycorrhizal plants inoculated with isolates from soils containing high levels of metals (i.e. *G. intraradices* n°1 and *G. mosseae* P2) showed lower Cd and Zn concentrations in shoots than plants inoculated with isolates from not contaminated soils. This is consistent with previous observations like results obtained by Diaz and coll. (1996) on Zn and Pb uptake by *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. Fungal isolates from contaminated areas seemed to have developed a strategy adapted to metal stress. The high metal-binding capacity of *G. mosseae* P2 external hyphae (Joner et al., 2000) may be one mechanism allowing the decrease of metal shoot concentrations. Nevertheless, the influence of this metal-tolerant fungus on plant fitness and Cd transfer seemed to vary according to the host plant and growth substrate. Weissenhorn and Leyval (1995) reported no significant effects of *G. mosseae* P2 on maize grown in sand contaminated with less than 2 mg L<sup>-1</sup> of Cd as compared to non-mycorrhizal treatment. The same fungus had also no significant effect and even tended to decrease shoot biomass of *Trifolium subterraneum* grown in a soil contaminated with 200 mg Zn kg<sup>-1</sup> and 2 mg Cd kg<sup>-1</sup> (Tonin et al., 2001). Orłowska et al. (2005) pointed out the better ability of AM fungi from metal contaminated soils to colonise roots in heavy metal polluted soils and insisted upon the importance of selection of the most efficient inoculum. Our data confirmed previously shown results that fungi isolated from metal contaminated soils increase metal tolerance of plants growing in polluted soils by decreasing plant concentration. This was true for *G. intraradices* n°1 and *G. mosseae* P2.

However, for *G. intraradices* n°1 the lower Cd and slightly lower Zn concentrations in shoots might be at least partly the result of a dilution effect due to the higher growth rate. The higher biomass of *G.i.* n°1 inoculated plants was associated to the presence of numerous root nodules. The PCR amplification of the nodC gene indicated that nodulating bacteria were not brought by *Gi* n°1 inoculum. Root nodulation by indigenous bacteria could thus have been stimulated by this fungal isolate, whilst the other fungal isolates did not. Interactions between bacteria and fungi were often studied (Artursson et al., 2006) and may play a crucial role in crop system. Association with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) was also shown to give beneficial effects to mycorrhizal plant tolerance to Cd contamination (Vivas et al., 2003). Thus, not only fungal tolerance and ability to reduce metal concentrations in plants but also AM interactions with PGPR might contribute to the improved plant biomass and reduced metal concentration in *M. truncatula* by *G. intraradices* n°1. *Rhizobium* are sensitive to Cd (EC<sub>50</sub> range from 1.5 to 9.5 μM) (Neumann et al., 1998), but metal tolerant isolates of *Rhizobium* were also reported (Lakzian et al., 2002). This major plant growth effect due to

AM inoculation might be due to a N response, even if the total N content in soil was not low (typical of agricultural soils) and was enriched by weekly fertilisation during the experiment, but could also be intensified by a fungal response to heavy metal stress. Both nutritional and metal response mechanisms could thus have occurred.

On the other hand, when fungal strains are not metal-tolerant, they may have some difficulties to colonise roots because metal toxicity reduces spore germination of non tolerant isolates (Leyval et al., 1997). It may be a reason why inoculation with spores of *G. mosseae* BEG 12, which was not previously exposed to high levels of heavy metals and seemed to have a low tolerance (Weissenhorn et al., 1993), led to very low levels of colonisation. Metal toxicity can affect AM fungi at different life stages, from spore germination to hyphal elongation and root colonisation; tolerance can thus occur at different levels and is difficult to define. Fungal isolates can also tolerate high levels of metals without being natives of metal polluted areas and strongly colonise plants growing on a contaminated medium. Indeed, inoculation with *G. intraradices* n°2 (BEG 141) led to very high frequency of mycorrhization (F% = 100%), whilst it was not previously exposed to metals. Such a high level of infection tended to affect plant development as plant biomass was reduced by the presence of *G. intraradices* n°2 as compared to other treatments. Previous studies showed different effects of *G. intraradices* BEG 141 (*G.i.* n°2) colonising *Pisum sativum* in a 100 mg Cd kg<sup>-1</sup> contaminated soil/sand mix. The total amount of Cd transferred to shoots was enhanced in mycorrhizal pots, but it depended on the pea genotype (Rivera-Becerril et al., 2002). The comparison between *G. intraradices* n°1 and n°2, which had both well-colonised roots and soil, showed that the two isolates had different effects on root Cd and Zn concentrations. The fungus isolated from a metal-contaminated soil reduced Cd concentration in shoots and enhanced Zn concentration in roots, whilst the other did not significantly affect Cd plant uptake and increased Zn concentration in shoots. It thus seems that, even though both fungi showed a high colonisation rate and should be considered as tolerant to Cd and Zn concentrations present in the soil, metal uptake capacity differed between them and depended on the origin of the fungal isolates. Finally, the fungus isolated from a soil containing low concentrations of metals, *Glomus* sp., colonised roots at the same rate as *G. mosseae* P2, but although it slightly increased plant growth, this fungus had no significant effect on plant metal uptake. This could be due to the lower capacity for Cd sorption by *Glomus* sp. hyphae than *G. mosseae* P2 as previously shown by Joner et al (2000).

The different behaviour of fungal isolates also raises the question of the choice of plant-fungus associations to study gene expression during mycorrhizal symbiosis in metal stress

conditions. The response of a studied plant-fungus combination to metal stress may be different from one another because of the differential effects of fungal strains and also because plant genotypes differ in their ability to be colonised by AM fungi (Lingua et al., 2008).

Not only metal concentrations but also the total mass of metals transferred from soil to plant is important to consider when evaluating heavy metal partitioning in soil-plant systems. The total shoot metal content depends on plant biomass and the ability of mycorrhizal inoculation to affect plant growth seems to be the most important parameter concerning metal accumulation in plant. In previous studies, when plant biomass was sufficiently enhanced by fungal inoculation, mycorrhizae contributed to increase the total amount of Cd transferred to plants (Heggo et al., 1990; Lee and George, 2005; Redon et al., 2008). In the present experiment, the total Cd and Zn contents in the above-ground biomass were significantly increased only with *G. intraradices* n°1, where plant biomass was strongly enhanced. Plant age at harvest is also important to consider when metal uptake experiments are performed. Even if plant biomass was increased and shoot Cd and Zn concentrations were reduced in *Gi* n°1 treatment as compared to NM treatment after both 30 and 45 days, the quantities of Cd and Zn exported to shoots were significantly higher only after 45 days. When plants were younger the AM fungus did not improve plant biomass sufficiently to increase metal accumulation in shoots.

Although the quality of groundwater is very important for human consumption, very little information is available about AM fungal influence on metal transfer in leaching water. We recently showed that fungal inoculation with *G.intradices* n°1 reduced Cd concentration in leachates (Redon et al., 2008). In pots inoculated with fungi isolated from contaminated soils, pH of leachates was slightly decreased, which may have modified the behaviour of ionic elements. Such pH decrease should increase the availability of Cd in soil (Krishnamurti and Naidu, 2003), as well as Zn, which may increase the risk of transfer to leachates and plant. However, inoculation with *G. intraradices* n°1 did not increase, even tended to decrease, Cd concentration in leachates as compared to NM pots because it increased plant biomass and Cd uptake. Glomalin, a glycoprotein released by AM fungi (Wright and Upadhyaya, 1998), may also have played a role in Cd sequestration (González-Chávez et al., 2004) and reduction of Cd transfer in leachates. Cd concentrations in leachates were very variable among and within fungal treatments after 39 days of culture. Differences among treatments were observed after 39 days of culture but not after 11 and 24 days. Changes in pH and Cd concentrations of leachates can be due to the development of the root system and plant growth that may be

influenced by mycorrhizal colonisation. Cd is toxic at low concentrations (Wren et al., 1995) and limitation in water for human consumption is  $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$  as defined by the European directive 98/83/CE. As a result, a few dozen  $\mu\text{g L}^{-1}$  modification of Cd concentrations in leachates by AM fungal inoculation may be determinant for water quality. Zinc concentrations in leachates were below the guideline value of  $3 \text{ mg L}^{-1}$  in drinking-water acceptable to consumers as proposed by the World Health Organization (2003) based on taste considerations; toxic concentrations are by far higher than this value.

In conclusion, contribution of AM fungi on Cd and Zn transfer to the model legume *M. truncatula* varied according to the fungal isolate used as inoculum. Fungi isolated from metal polluted soils were more effective to reduce metal stress by decreasing shoot metal concentrations. This was not due to a higher ability of these fungi to colonise roots and to form external hyphae. However, the large improvement of shoot biomass by one isolate led to an increased plant metal uptake (+91% Cd to shoots and +71% Cd to roots with *G. intraradices* n°1 which increased by three the shoot biomass). Such improvement of plant biomass can be due to a close relationship between AM fungi and N-fixing nodulating bacteria. Finally, Cd concentrations in leachates were variable among fungal treatments but can be significantly affected by AM inoculation. Soil modification after fungal colonisation of the root system may certainly have impact on water quality.

### **Acknowledgements**

Authors would like to thank Vivienne Gianinazzi-Pearson (INRA Dijon) for providing seeds of *M. truncatula* and inoculum of *G. intraradices* BEG 141.

## Principaux résultats

Les champignons MA n'ont pas tous les mêmes effets sur le développement de la plante sur sol contaminé et sur le transfert de Cd. Plus que des variations interspécifiques, des différences entre champignons d'une même espèce mais d'origines différentes ont été observées. Globalement, pour 4 isolats de champignon sur 5, l'inoculation a augmenté la biomasse végétale. Le seul champignon qui a eu tendance à diminuer la biomasse de la plante hôte est le *Glomus intraradices* (Gi n°2) isolé d'un sol non contaminé. Les autres champignons ont amélioré la croissance de la plante mais le *Glomus intraradices* utilisé tout au long de ces travaux de thèse (Gi n°1) a eu un effet beaucoup plus important sur la croissance, multipliant la biomasse des parties aériennes par 3 et conduisant ainsi, malgré la diminution de concentration de Cd dans la plante, à un accroissement significatif de la quantité de Cd accumulée dans la plante (2 fois plus que le traitement non mycorhizé).

Cette forte croissance des plantes inoculées avec Gi n°1 était due au moins en partie à une association avec des bactéries formant des nodules. Dans le sol étudié, Gi n°1 a en effet favorisé la formation de nodules, contrairement aux autres champignons. L'interaction de champignons MA avec des bactéries nodulantes pourrait ainsi améliorer le développement de la plante dans un sol contaminé en ETM par une amélioration de la nutrition azotée, même si le sol était peu limitant en P et en N. Toutefois les teneurs en azote dans la plante n'ont pas été analysées. Un tel effet de l'inoculation mycorhizienne a aussi entraîné une diminution du pH et de la concentration en Cd des lixiviats. Il est probable que cette modification chimique des lixiviats soit liée à l'augmentation de la biomasse végétale (plus forte exsudation racinaire, flux d'eau et d'éléments plus importants). Une interaction champignon-bactéries si remarquable a néanmoins posé des interrogations quant à la présence de *Rhizobium* dans l'inoculum de G.i. n°1. Nous avons alors réalisé des amplifications par PCR du gène nodC (un gène essentiel de la nodulation chez les bactéries) dans l'inoculum et les racines obtenues à l'issue de l'expérience pour montrer l'absence de *Rhizobium* dans l'inoculum alors que ces bactéries ont été détectées dans les racines portant des nodules (Annexe 4). De plus, dans une culture test de luzernes inoculées avec *G. intraradices* n°1 sur un sol stérilisé non réinoculé avec sa microflore bactérienne, aucune nodosité n'a été observée (Annexe 5).

La durée de la culture est aussi un paramètre important pour le bilan de Cd. Contrairement aux plantes de 45 jours, la quantité totale de Cd transférée au bout de 30 jours

de culture aux plantes inoculées avec Gi n°1 n'était pas significativement différente de celle transférée aux plantes non mycorhizées, bien qu'à 30 jours le champignon ait déjà bien colonisé les racines et ait amélioré la croissance de la plante. Au bout de 45 jours de culture, la quantité totale de Cd exportée dans les parties aériennes était alors 4 fois plus importante qu'au bout de 30 jours. Pour d'éventuelles applications *in situ*, la durée des cycles de culture devrait donc être prise en considération en fonction des quantités de polluants que l'on souhaite atteindre ou ne pas dépasser dans les plantes.

La contribution des champignons MA observée n'est pas seulement valable que pour le transfert de Cd. Les bilans du zinc et, dans une moindre mesure, du plomb dans la plante ont été influencés de la même manière que le cadmium par l'inoculation MA. Les différents mécanismes de transport et/ou d'immobilisation des ETM utilisés par les différents isolats fongiques ne semblent donc pas discriminer un ETM plus qu'un autre.

Concernant les différences observées entre des champignons isolés de sols contaminés ou non, les isolats provenant de sites contaminés en ETM et adaptés au stress métallique (Gi n°1 et Gm P2) ont entraîné une réduction des concentrations en ETM et en phosphore dans les parties aériennes par rapport aux isolats de sites non contaminés et au traitement non mycorhizé. Cette réduction de la translocation des ETM pourrait être liée à une forte sorption par le mycélium extraracinaire qui immobilise les métaux dans le sol, en particulier pour *G. mosseae* P2 dont l'effet sur la biomasse n'était pas significativement différent de Gm et Gsp et pour lequel un « effet dilution » était donc exclu.

### III. Expérience 3 : Cinétique d'absorption du Cd par *Medicago truncatula* et contribution de la mycorhization.

#### Introduction/Objectif de l'expérience

Dans les deux premières expériences, l'étude du transfert de Cd vers des plantes mycorhizées portait sur des systèmes complexes permettant de donner une vue générale de leur fonctionnement et de réaliser des bilans de matière. Sur des temps de culture relativement longs (45 jours), l'influence globale de l'inoculation d'un champignon MA sur le transfert de Cd a ainsi été évaluée en fonction des caractéristiques des sols et du champignon inoculé.

Par contre, les mécanismes mycorhiziens à l'origine des effets de l'inoculation n'ont pas pu être précisés car le mycélium fongique n'est pas séparé des racines. Comme ces champignons ne peuvent pas être cultivés en absence d'une plante hôte, leur effet direct sur la mobilité des polluants ne peut pas être étudié en cultures pures. Pour cela, des dispositifs à compartiments doivent être utilisés. Différents dispositifs ont été développés dans les études menées sur les champignons mycorhiziens à arbuscules. Les systèmes de culture à compartiments utilisent des barrières physiques (grilles, toiles à mailles fines...) pour empêcher les racines de passer dans un compartiment d'intérêt mais pas les hyphes du champignon. Les hyphes peuvent ainsi se développer dans un substrat sans la participation des racines. De plus, la séparation du mycélium et des racines facilite l'isolement de matériel fongique pour des analyses post-culturelles de celui-ci.

Plusieurs travaux antérieurs ont mis en évidence une immobilisation plus importante des ETM dans la rhizosphère de plantes mycorhizées cultivées en présence de métaux (Galli et al., 1994 ; Joner et Leyval, 1997 ; Janoušková et al., 2006). Le mycélium des champignons MA peut en effet séquestrer les métaux grâce à une forte capacité de sorption, en particulier dans le cas de champignons tolérants aux métaux comme *G. mosseae* P2 (Joner et al., 2000).

L'objectif de notre expérience était de vérifier si les résultats obtenus avec *Glomus intraradices* (G.i. n°1) dans les chapitres précédents pouvaient être liés en partie à une accumulation et une immobilisation du cadmium par les hyphes de ce champignon. En d'autres termes, la présence du champignon MA modifie-t-elle la sorption à court terme de Cd par le système racinaire? Sur le modèle des cinétiques d'absorption de Cd réalisées sur des

plantes en hydroponie pour l'étude des mécanismes d'absorption du Cd, nous avons ainsi voulu comparer les capacités de sorption de plantes non mycorhizées et mycorhizées par ce champignon et la sorption par les hyphes. Pour cela, des plantes inoculées ou non avec *G. intraradices* ont été pré-cultivées dans des dispositifs à compartiments modifiés avec des substrats peu absorbants pour effectuer des expériences de cinétique de sorption de cadmium radioactif ( $\text{Cd}^{109}$ ) pendant 24 heures sur ces plantes à différents âges. Après 24h de sorption, la compartimentation du dispositif utilisé permettait de récolter facilement du mycélium pour mesurer la quantité de  $\text{Cd}^{109}$  sorbé par le champignon.

Toutefois, la colonisation mycorhizienne et la production des hyphes extra-racinaires dans ces conditions expérimentales ne se sont pas bien développés et la biomasse fongique n'a pu être observée qu'avec les plantes les plus âgées (150 jours). Les plantes plus jeunes (âgées de 45, 75 et 100 jours) ont alors été exploitées comme des traitements non mycorhizés pour évaluer le comportement de l'espèce végétale *Medicago truncatula* vis-à-vis de la sorption du Cd et pour mesurer la reproductibilité de cette expérience originale. En effet, à notre connaissance, il s'agit de la première étude de cinétique d'absorption d'ETM par un système plante – champignon MA entier.

À soumettre

**Kinetics of cadmium sorption by nonmycorrhizal and mycorrhizal *Medicago truncatula***P.-O. Redon<sup>1</sup>, P. Leglize<sup>2</sup>, T. Béguiristain<sup>1</sup>, T. Sterckeman<sup>2</sup> and C. Leyval<sup>1</sup>

<sup>1</sup> LIMOS, Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols, Nancy-University, CNRS ; Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex, France.

<sup>2</sup> LSE, Laboratoire Sols et Environnement, INPL (ENSAIA) ; BP 172, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex, France.

**Abstract**

Short-term cadmium (Cd) sorption by plants is important to assess in order to better understand the mechanisms of metal uptake. Arbuscular mycorrhizae (AM) are ubiquitous actors of the root system uptake but were never studied in hydroponic sorption kinetics. A soil-free compartmented device was used to measure the <sup>109</sup>Cd sorption capacity for 24 h of *Medicago truncatula* at different ages and to compare Cd sorption by mycorrhizal and non-mycorrhizal medics. The device allowed harvesting AM hyphae and to measure their Cd binding capacity in comparison to plant roots. 24 h – sorption kinetics by non-mycorrhizal plants were consistent at different ages. Within the experimental conditions of the study, roots accumulated very large amounts of Cd which were strongly bound to root cells. Root sorption seemed to vary according to plant age and vitality, with younger plants being more effective in Cd sorption. No differences in Cd shoot uptake and in Cd sorption to roots between mycorrhizal and non-mycorrhizal medics (150 days-old) were observed. However, Cd concentrations in hyphae and in roots were equivalent but hyphal biomass was too low to significantly increase total Cd sorption during 24 h.

**Keywords** Cadmium, arbuscular mycorrhiza, *Medicago truncatula*, soil-free device, sorption kinetics

## Introduction

Among trace metals, cadmium (Cd) has been particularly studied because of its acute toxicity for living organisms (Satoh et al., 2002; WHO, 2004; Baker and Walker, 1989) and its mobility in soil-plant systems (Sterckeman et al., 2000; Prokop et al., 2003). Increasing metal levels in soils are recorded and such pollution is problematic due to its persistence in the environment. Monitoring Cd uptake by plants is thus of major importance to avoid metal accumulation and contamination of the food chain. Cd behaviour in soil-plant systems needs to be better understood to improve crop quality and to stay below the maximum levels in foodstuffs as defined by the regulation commissions of the different countries. However, in some polluted sites, soil remediation technologies must be applied. As metals are non-degradable compounds, their cleanup often requires their removal. Phytoextraction, the use of plants to extract pollutants from soil, was proposed as a low-cost and environment-friendly method for soil remediation (Cunningham et al., 1995), but the development of such a technology for future effective applications needs further research on metal soil-plant transfer.

The growth of plants in hydroponic solutions spiked with Cd was often used to study Cd uptake mechanisms (Salt et al., 1995; 1997; Rauser and Meuwly, 1995; Lozano-Rodríguez et al., 1997) and plant responses to metal stress (Sneller et al., 1999; Dixit et al., 2001; Sandalio et al., 2001; Lima et al., 2006). Hydroponic cultures allow an accurate control of the conditions influencing Cd sorption and uptake by plants. Previous results suggested a non-specific and unregulated transport of Cd in maize roots, dependent on the composition of the rhizospheric solution and on plant age (Perriguet et al., 2008). Cd uptake by plant varied according to many parameters as plant species (Jarvis et al., 1976), pH in solution (Ohya et al., 2005), Cd concentration, presence of divalent cations ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Zhao et al., 2005) or addition of complexing agents (e.g. EDTA) (Schaidler et al., 2006). Cd accumulation in shoots depends on root absorption and root to shoot translocation both driven by transpiration (Van der Liet et al., 2007). Cd also affects transpiration, through stomatal closure, by entering the cytosol of the guard cells via  $\text{Ca}^{2+}$  channels (Perfus-Barbeoch et al., 2002). Concentration-dependent kinetics for Cd influx in roots can be resolved into a linear component and a saturable component following Michaelis-Menten kinetics (Hart et al., 1998). The linear kinetics tally with an apoplastically bound  $\text{Cd}^{2+}$  while the saturable component reflects a transporter-mediated  $\text{Cd}^{2+}$  influx across the plasmic membrane of root cells (Cohen et al., 1998).

Uptake of Cd in solution by plant was thus widely studied and many mechanisms were highlighted but the effect of the microbial component of rhizosphere is difficult to assess in this kind of soil-free systems. The role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi should be taken into account because they are ubiquitous actors of the root system uptake (Smith and Read, 1997). Colonizing most of the terrestrial plants, these symbiotic fungi play a major role in plant nutrition, especially of P (Requena, 2005), and in metal stress protection (Khan et al., 2005). Extraradical mycelium of AM fungi may act as extensions of roots, it increases the volume of soil explored which may improve metal absorption by roots. Fungal mycelium is able to transport Cd to roots and to immobilize it in the root system (Joner and Leyval, 1997), reducing root to shoot translocation. This could be due to the metal-binding capacity of fungi (Joner et al., 2000). AM fungi are also able to increase shoot biomass under stress conditions which strongly enhance the amount of Cd transferred to the plant (Redon et al, 2008). However, the study of the impact of AM fungi on Cd uptake is difficult to evaluate in pure culture because arbuscular mycorrhizae cannot be cultivated without host plant. Compartmented devices are useful to isolate some fungal material from the roots and to assess the effect of the fungus on metal transfer. Using such compartmented devices over a 45 days experiment, Joner and Leyval (1997) showed the transfer of Cd to roots by AM hyphae.

We used soil-free compartmented devices to measure the relatively short term (24 hours) Cd sorption ability of non-mycorrhizal barrel medic (*Medicago truncatula*) at different ages and to compare the 24 h-sorption of Cd by mycorrhizal and non-mycorrhizal medics and by AM hyphae.

## Materials and methods

### Growth in compartmented system

A two-compartment culture device (1 L pots), adapted from Joner et al. (2000), was used to grow barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn. line J5) colonized (M) or not (NM) by an AM fungus (*Glomus intraradices*) isolated from a metal contaminated soil and supplied by the Institut für Pflanzenkultur (Solkau, Germany). The culture device was divided into a central root compartment (RC) filled with 445 g of coarse sand (>0.5mm), and a peripheral hyphal compartment (HC) filled with 865 g of glass beads (Ø 1.5 mm 50%, Ø 3 mm 50%). Sand and glass beads were acid-washed and heat sterilized. Such cultivation media have the advantage to provide pure fungal materials which can be easily separated from the medium

(Chen et al., 2001). The hyphal compartment, separated from the RC by a 20  $\mu\text{m}$  nylon mesh, was accessed only by mycorrhizal hyphae. It was covered with non-transparent plastic to minimize algal growth. Three surface sterilized seeds (ethanol 50% for 5 min, calcium hypochlorite 20% for 20 min, chloramine T 2% for 10 min, streptomycin 2% + one drop of TWEEN 80 for 10 min, seeds were rinsed twice with distilled water after each bath) were germinated in an upper compartment filled with 20 g of wet vermiculite separated from the RC compartment by a 1 mm nylon mesh. In mycorrhizal pots, 150 mg of wet inoculum (= rehydrated root fragments colonized by *Glomus intraradices*) were placed under the upper vermiculite compartment at the surface of the root compartment. A few days after germination, medicus were thinned to one plant per pot. Plants were watered daily at 60% of water holding capacity with a P-deficient nutrient solution (1 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 1 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; 0.75 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 12.5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 2.5  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0.3  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.05  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.2  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.2  $\mu\text{M}$   $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 20  $\mu\text{M}$  Fe-EDTA) and were grown in a growth chamber under controlled conditions (16 h photoperiod, 22°C/18°C day/night, 400  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 70% relative humidity). Non mycorrhizal plants were grown for 45, 75, 100 and 150 days, and mycorrhizal plants were grown for 150 days, in order to obtain a large development of extraradical hyphae. After 45 days, glass beads (HC) were renewed every three weeks to stimulate growth of new hyphae and prevent the formation of spores (Briones, 2002). Four replicates per treatment were performed.

### $^{109}\text{Cd}$ sorption kinetics

At the different times of culture, the whole compartmented devices were rinsed with  $\text{CaCl}_2$  0.5mM and bathed in 2 L of a buffered Cd solution ( $\text{CdSO}_4$  13  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM; MES 20 mM; pH=5.5) homogenized by magnetic agitation. This solution was spiked with 1 mL of  $^{109}\text{Cd}$  radioactive solution (370 kBq) 5 minutes before soaking the system for 24 h. Sorption of Cd was monitored by measuring the depletion of radioactive activity in the solution. Activity in 1 mL of solution was measured by  $\gamma$ -counting (Wallac 1480 Wizard<sup>®</sup> 3 gamma counter) after 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h and 24 h. At the end of the kinetics, after draining, the system was bathed in a high-concentrated Cd desorption solution ( $\text{CdSO}_4$  534  $\mu\text{M}$  +  $\text{CaCl}_2$  0.5 mM) in ice for 1h. Activity in the desorption solution was counted. Then, the system was rinsed with  $\text{CaCl}_2$  0.5mM and plant shoots were cut. Hyphae

in HC and roots in RC were harvested by flotation and sieved on a 20  $\mu\text{m}$  nylon mesh. Fresh weights of hyphae, shoots and roots were measured. Shoots and roots were oven dried at 70°C and their dry weights were recorded. Radioactivity in plant and fungal tissues was measured by  $\gamma$ -counting.

For calculations of Cd concentrations in plants, different specific activities were assumed at the different plant ages. Specific activities of 3910, 3670, 3570 and 4790  $\text{cpm } \mu\text{g}^{-1}$  Cd were calculated from the quantities of Cd and  $^{109}\text{Cd}$  added in solution with 45, 75, 100 and 150 days old medics, respectively.

### Statistical analysis

Mean comparisons and analysis of variance (ANOVA) were performed with the R program. Tukey's test was used for post-hoc analyses. Least square method was used for curve fitting.

## Results

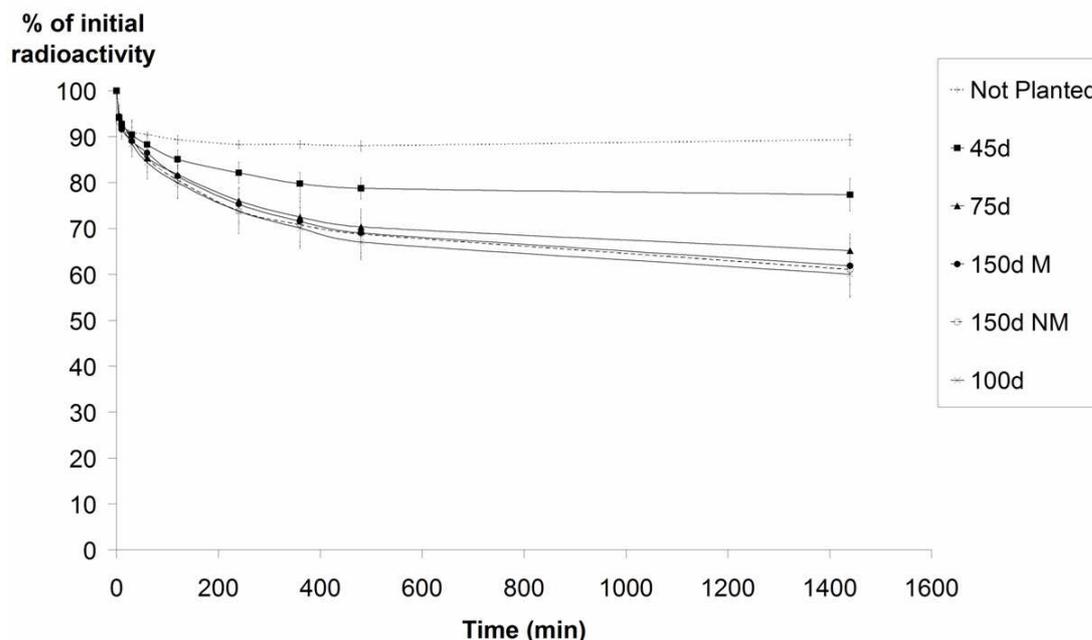


Figure 1: Depletion of  $^{109}\text{Cd}$  from solution by compartmented systems planted with *Medicago truncatula* at different ages. 150-days old medics were inoculated (M) or not (NM) with *Glomus intraradices*. Values are means of eight (45 days and 75 days-old plants) or four replicates (100 days and 150 days-old plants). Error bars are standard deviations.

## Cd sorption by barrel medic at different ages

Radioactivity in solution decreased over time when the compartmented systems were soaked (Figure 1). Cd sorption by non-planted systems was fast (saturation was observed after 60 min) and represented 10% of the initial radioactivity. Younger (45-days old) plants sorbed significantly less Cd (23% of the initial radioactivity) than older plants (40% of the initial radioactivity) (Figure 2).

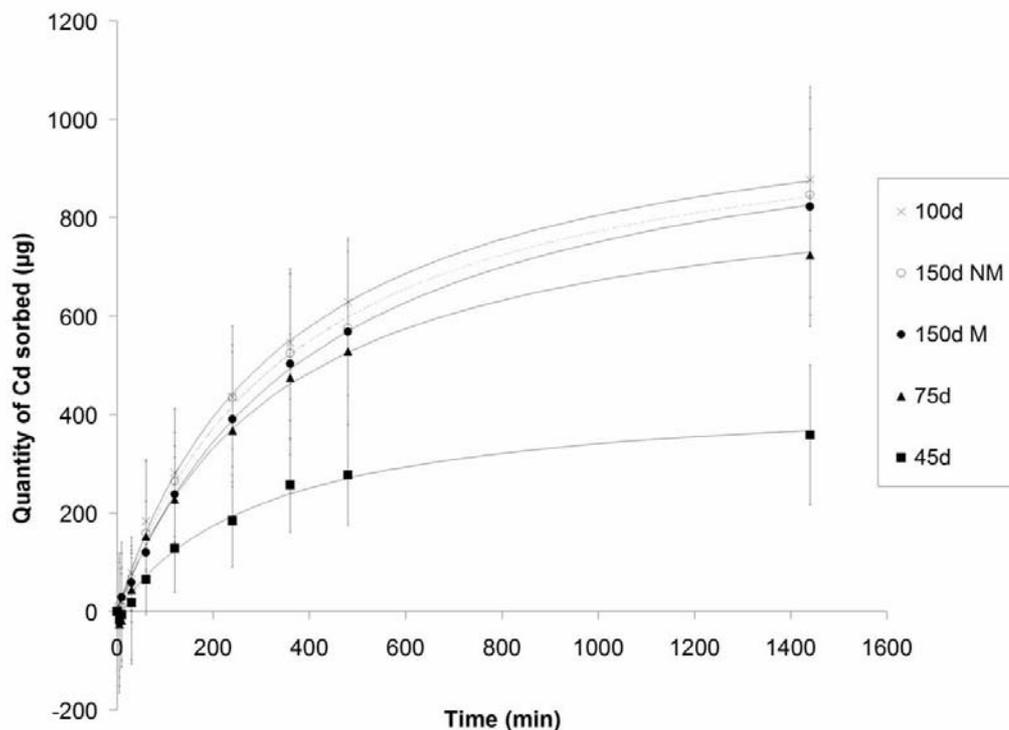


Figure 2: Quantity of Cd sorbed ( $\mu\text{g}$ ) by *Medicago truncatula* at different ages after subtraction of the mean quantity of Cd sorbed by non-planted systems. 150-days old medics were inoculated (M) or not (NM) with *Glomus intraradices*. Values are means of eight (45 days and 75 days-old plants) or four replicates (100 days and 150 days-old plants). Error bars are standard deviations.

No significant differences of 24h-sorbed radioactivity were observed between 75 days, 100 days and 150 days old plants, while shoot biomass of 150 days old plants was significantly different from 75 and 100 days old plants (Table 1). Shoot dry weights increased significantly ( $p < 0.001$ ) with plant age but root dry weights were not significantly different. The percentage of radioactivity sorbed after 24 h by 45, 75 and 100 days old plants increased

linearly with shoot dry weight ( $R^2 = 0.9129$ ). 150 days old plants sorbed less radioactivity relatively to their dry shoot biomass ( $15.3 \pm 3.0 \% \text{ g}^{-1}$ ) than younger plants ( $27.9 \pm 8.5 \% \text{ g}^{-1}$ ). Cd influx per plant dry weight per minute between each point was calculated (Table 2).

*Table 1: Shoot and root biomass of Medicago truncatula at different ages. Values are means of eight (45 days and 75 days-old plants) or four replicates (100 days and 150 days-old plants)  $\pm$  standard deviation. M = mycorrhizal plants, NM = non mycorrhizal plants. Means in the same column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level.*

Age	Dry weights (g)	
	Shoot	Root
45 days	$0.63 \pm 0.14$ a	$0.92 \pm 0.29$ a
75 days	$1.65 \pm 0.08$ b	$1.32 \pm 0.24$ a
100 days	$1.71 \pm 0.15$ b	$1.39 \pm 0.17$ a
150 days NM	$2.32 \pm 0.30$ c	$1.56 \pm 0.32$ a
150 days M	$2.84 \pm 0.76$ c	$1.52 \pm 0.81$ a

Influx was the highest within the first ten minutes and decreased with time. 45-days old plants sorbed significantly more Cd in the first five minutes than older plants, then differences of influx between plant ages were not significant until the end of the experiment. The amounts of radioactivity desorbed varied from 2.3 to 5.4% of the total amount sorbed after 24h and were not significantly different between treatments (Table 3). The quantities (cpm) desorbed from planted pots were not significantly different from not planted pots either (data not shown).

Cd concentrations in plant tissues (Table 3), calculated from radioactivity counting, showed that roots contained  $10^4$ -fold more Cd than shoots. Cd root concentrations in 150 days old plants were significantly lower than in younger plants. No significant differences were observed for shoot Cd concentrations.

Table 2: Influx of Cd per plant dry weight per minute ( $\mu\text{gCd gDW}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) during 24h of sorption. Values are means of eight (45 days and 75 days-old plants) or four replicates (100 days and 150 days-old plants)  $\pm$  standard deviation. M = mycorrhizal plants, NM = non mycorrhizal plants.

Time (min)	Plant age (days)				
	45	75	100	150 NM	150 M
5	23.95 $\pm$ 8.89 a	11.26 $\pm$ 4.54 b	11.73 $\pm$ 4.58 b	10.77 $\pm$ 2.07 b	8.17 $\pm$ 4.91 b
10	5.95 $\pm$ 4.19	2.70 $\pm$ 5.94	3.19 $\pm$ 1.32	1.75 $\pm$ 2.05	3.86 $\pm$ 4.24
30	2.32 $\pm$ 1.74	1.81 $\pm$ 0.37	1.93 $\pm$ 0.55	1.12 $\pm$ 1.18	1.12 $\pm$ 0.97
60	1.48 $\pm$ 1.16	1.44 $\pm$ 0.72	1.33 $\pm$ 0.81	1.14 $\pm$ 0.18	0.63 $\pm$ 0.21
120	1.06 $\pm$ 0.33	0.60 $\pm$ 0.39	0.72 $\pm$ 0.17	0.63 $\pm$ 0.30	0.66 $\pm$ 0.35
240	0.48 $\pm$ 0.31	0.48 $\pm$ 0.19	0.50 $\pm$ 0.07	0.44 $\pm$ 0.14	0.36 $\pm$ 0.14
360	0.39 $\pm$ 0.32	0.30 $\pm$ 0.09	0.30 $\pm$ 0.06	0.19 $\pm$ 0.09	0.23 $\pm$ 0.13
480	0.18 $\pm$ 0.19	0.18 $\pm$ 0.07	0.25 $\pm$ 0.08	0.13 $\pm$ 0.05	0.14 $\pm$ 0.09
1440	0.03 $\pm$ 0.04	0.05 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.02

Table 3: Cd concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$ ) in shoots and roots of 45, 75, 100 and 150 days old *Medicago truncatula* after 24h of sorption, and desorbed radioactivity (% of total radioactivity absorbed). M = mycorrhizal plants, NM = non mycorrhizal plants, NP = not planted. Values are means of eight (45 days and 75 days-old plants) or four replicates (100 days and 150 days-old plants)  $\pm$  standard deviation. Means in the same column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level.

Plant age (days)	Shoot * $10^{-3}$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Root ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Desorption (%)
45	56 $\pm$ 36 a	418 $\pm$ 47 a	5.4 $\pm$ 2.4 a
75	53 $\pm$ 36 a	472 $\pm$ 82 a	2.7 $\pm$ 2.4 a
100	60 $\pm$ 19 a	439 $\pm$ 14 a	2.3 $\pm$ 1.1 a
150 NM	33 $\pm$ 21 a	305 $\pm$ 69 b	3.4 $\pm$ 1.3 a
150 M	48 $\pm$ 31 a	253 $\pm$ 34 b	3.0 $\pm$ 0.3 a
NP	0	0	6.0 $\pm$ 3.2 a

## Cd sorption by mycorrhizal (M) and non-mycorrhizal (NM) medic

The 24h-sorption of  $^{109}\text{Cd}$  by M medic was not significantly different from sorption by NM medic (Figure 2). AM inoculation did not improve plant biomass significantly (Table 1). The highest amounts of radioactivity were observed in roots, without any difference between M and NM roots (Table 4a). Total radioactivity counted in shoots and hyphae was very low as compared to that found in roots. Per biomass unit (g Fresh Weight),  $^{109}\text{Cd}$  concentration in hyphae was equal to the concentration in roots (Table 4b). Cd sorption was calculated and represented  $26.3 \pm 4.2 \mu\text{g g}^{-1}$  of fresh weight for roots and  $25.2 \pm 5.9 \mu\text{g g}^{-1}$  for hyphae. The mass of mycelium collected reached 0.035 g mean FW while the root biomass was 15.5 g mean FW.

Table 4: Accumulation of total radioactivity (A) and activity per fresh weight (B) in 150 days-old *Medicago truncatula* and fungal mycelium (*Glomus intraradices*). M = mycorrhizal plants, NM = not mycorrhizal plants. Shoot and root values are means of four replicates, while hyphae values are means of three replicates  $\pm$  standard deviation.

(A)

	Total activity (cpm)		
	Shoot	Root	Hyphae
M	611 $\pm$ 300	1 835 168 $\pm$ 1 038 496	3 500 $\pm$ 3 622
NM	388 $\pm$ 314	2 242 365 $\pm$ 499 240	No value

(B)

	Activity per mass (cpm gFW $^{-1}$ )		
	Shoot	Root	Hyphae
M	62 $\pm$ 34	125 685 $\pm$ 19 474	120 606 $\pm$ 28 014
NM	45 $\pm$ 31	133 406 $\pm$ 26 160	No value

## Discussion

As compared to sorption studies where plant roots are soaked in a solution, our system added materials (nylon mesh, PVC, glass beads, sand) which sorbed 10% of the initial radioactivity. The quantity of radioactivity sorbed by these materials was not too high which allowed measuring the amounts sorbed by plants. Cd sorption by non-planted pots was relatively fast, nevertheless, during the first hour, sorption on materials and on root cell wall could not be distinguished because the percentage of initial radioactivity remaining in solution after 60 minutes was not significantly different between planted and non planted pots. As shown by values of desorption, reversible sorption of  $^{109}\text{Cd}$  represented only a few percents of the sorbed  $^{109}\text{Cd}$ . Most of the  $^{109}\text{Cd}$  desorbed was sorbed on the device; it thus seemed that the  $^{109}\text{Cd}$  sorbed by plants was strongly bound in plant cells.

*Medicago truncatula* accumulated very large amounts of Cd in roots. Greater Cd concentrations in roots than in shoots for most plant species were reported by Jarvis et al. (1976). They soaked 38 or 55 days old plants in Cd solution (0.01 ppm Cd) for 7 days and they observed root/shoot concentration ratios ranging from 3.2 (lettuce) to 66 (parsnip). In our experiment the mean ratio Cd root / Cd shoot concentration was very high (7640). This high ratio means that Cd was mostly retained into the roots and that small amounts of Cd were translocated to the shoots, maybe because the sorption experiment was short (24h). Due to the experimental device, roots were not directly soaked in the spiked solution and longer time may have been needed to observe more Cd transfer to shoots. Mature plants were also used in the experiment whereas many studies assessed Cd sorption by seedlings (Dixit et al., 2001; Sandalio et al., 2001). Plant physiology and experimental conditions may have influenced the Cd root sorption capacity and transfer to shoots. The low level of Cd translocation observed may be due to a low ability of roots to transport metal to shoots. In the conditions of the study, most of the sorbed  $^{109}\text{Cd}$  was irreversibly accumulated in roots and few  $^{109}\text{Cd}$  passed in the xylem flow. Cd accumulation can occur on the cell wall, in the cytosol or in storage structures (vacuoles) (Turnau et al., 1993; González-Guerrero et al., 2008) but the experiment did not allow to precisely localize Cd. The sorption kinetics depended on plant age, more precisely, on plant biomass and vitality. When medics were older (75 and 100 days), and thus bigger, the quantity of sorbed Cd was higher, but when plants were 150 days they did not sorb more Cd despite a higher biomass, indicating a lower vitality. At this stage (pods were observed), medics were less leafy than younger plants and as senescent foliage affects the transpiration flow (Ramírez et al., 2006), it may have reduced Cd uptake. Furthermore, Cd accumulation in

the first 10 minutes was faster (influx was higher) in the 45-days old medics than in the older plants. This illustrates a more efficient uptake by young than older roots which is in agreement with previous studies (Mullins and Sommers, 1986; Perriguet et al., 2008).

No differences in Cd shoot uptake and in Cd sorption to roots between mycorrhizal and non-mycorrhizal medics were observed. Within the conditions of the study, plant biomass was not increased by mycorrhizal inoculation maybe because the volume available for root development was small. Indeed, a small pot volume was shown to reduce mycorrhizal effects because of high root density (Joner and Leyval, 2001). As compared to previous experiments (Redon et al., 2008; Redon et al., 2009), plants did not suffer from metal stress and, due to the growth media used, nutrients were highly available during the growth period, which can also have reduced the mycorrhizal effect. Since M and NM plants had the same root and shoot biomass, a larger depletion of Cd in solution due to different plant sizes was excluded. However, a higher Cd accumulation in mycorrhizal roots was expected due to the presence of extraradical hyphae which were shown to bind more metal than roots (Joner et al., 2000; Chen et al., 2001), but the presence of AM mycelium in our soil-free device did not improve Cd sorption. Cd concentrations in hyphae and in roots, per fresh weight, were equivalent. However, the quantity of hyphae was low in comparison to root biomass and the quantity of Cd sorbed by hyphae was too low as compared to the quantity sorbed by roots to affect significantly Cd sorption by mycorrhizal plants. Very few studies dealt with Cd sorption by AM fungi because AM fungal mycelium is difficult to isolate. The results indicated that fresh hyphae had the same Cd fixation capacity as fresh roots. They reinforce the statement that extraradical mycelium of AM fungi act as extensions of roots. *Glomus intraradices* hyphae had the same Cd sorption capacity as medic roots. On the contrary, Joner et al. (2000) reported higher Cd sorption with hyphae of *Glomus mosseae* than with clover roots, even if sorptions to mycorrhizal and non-mycorrhizal roots were not different. At comparable solution concentrations, values of sorption reported by Joner et al. (2000) were higher than in our experiment but different experimental conditions were used. Especially, excised roots and hyphae were used and incubated in unbuffered solution whereas we soaked the whole plant-fungus system in a buffered solution containing  $\text{Ca}^{2+}$ , which act as a competing ion and decreases  $\text{Cd}^{2+}$  sorption. Others studies showed higher accumulation of Cd (Janoušková et al., 2006) or Zn (Chen et al., 2001) in extraradical AM mycelium than in host roots. However, they all reported metal concentrations per hyphal dry weight, while we measured Cd concentrations in fresh mycelium. Hyphal water content may have been higher than root water content and this may contribute to explain our results. Different AM fungal species also

have different tolerance mechanisms and sorption capacities, as shown by Joner et al. (2000) for cadmium and by Gonzalez-Chavez et al. (2002) for copper. The choice of the fungal isolate studied is thus a crucial component of the variability of the sorption results observed.

Values reported in the literature suggest the quantitative importance of AM fungal hyphae in soils. In a field study, Miller et al. (1995) measured external hyphal lengths up to  $111 \text{ m cm}^{-3}$  of soil in a tallgrass prairie and calculated hyphal dry weights of  $457 \mu\text{g cm}^{-3}$  of soil. Such a widespread mycelial net in the soil may immobilize large amounts of Cd. For example, 3 L of soil may contain 1.4 g of dry hyphae which could absorb 350  $\mu\text{g}$  of Cd (if we assume  $25 \mu\text{g Cd g}^{-1}$  of hyphal fresh weight and a ratio fw:dw equal to 10). In a system where extraradical mycelium is more abundant and where the fungus has more volume to explore, the quantity of Cd accumulated in the mycorrhizosphere may be increased. Nevertheless, in laboratory studies where two-compartment pots are used, the hyphal length measured was often lower than in field studies. With clover grown in a sandy soil, Jakobsen et al. (1992) harvested up to  $26 \text{ m g}^{-1}$  dry soil of *Scutellospora calospora*'s hyphae in the root compartment with decreasing hyphal length when the distance to the roots increased. The utilization of sand or glass beads as growth media even lead to lower fungal biomass:  $124 \text{ cm g}^{-1}$  (about  $7 \mu\text{g g}^{-1}$  with tobacco inoculated with *Glomus intraradices*) in sand (Janoušková et al., 2006) and up to  $30 \mu\text{g cm}^{-3}$  in glass beads with maize inoculated with *Glomus versiforme* (Chen et al., 2001). It thus seems difficult to achieve the same fungal yield in laboratory experiment as in field studies and we can wonder whether pot experiments do not underestimate AM contribution.

## Conclusion

The compartmented device used in the study was suitable to follow Cd sorption kinetics of a whole plant-fungus system during 24h in hydroponic conditions. It allows taking into account the arbuscular mycorrhizal component of the rhizosphere in short-term experiments without overlooking the flux of elements in the plant, as it could be the case in sorption experiment using excised hyphae or roots. Within the conditions of the study, the ability of mycorrhizal species to sorb Cd in solution was not significantly different from the sorption by non-mycorrhizal species, even though extraradical mycelium had the same sorption capacity as roots. An improved development of fungal mycelium and an effect of mycorrhizal inoculation on plant growth and metal tolerance may have increased Cd uptake.

**Acknowledgements**

Authors would like to thank Vivienne Gianinazzi-Pearson (INRA Dijon, France) for providing seeds of *Medicago truncatula* and Stéphane Colin (INPL Vandoeuvre-lès-Nancy, France) for technical help on  $\gamma$ -counting.

## Principaux résultats

Le dispositif employé dans cette expérience permet de suivre la sorption à court terme du cadmium par la plante tout en prenant en compte la composante mycorhizienne de la rhizosphère. Une étude à court terme (24 h) permet de mesurer la capacité des racines à immobiliser le cadmium en solution tamponnée en minimisant les effets des parties aériennes de la plante (flux de transpiration) et des modifications rhizosphériques (exsudation racinaire). Ainsi, ce sont les racines des plantes, relativement âgées par rapport aux études de cinétiques d'absorption réalisées classiquement, qui ont accumulé la majorité du Cd sorbé par l'ensemble du dispositif au bout de 24 heures. Peu de Cd a été transféré aux parties aériennes et la fixation du Cd par les racines était non-réversible vu qu'une faible quantité de Cd a été désorbée. Les plantes les plus jeunes (45 jours) ont sorbé significativement moins de Cd en 24 heures que les plantes plus âgées (75, 100 et 150 jours) car leur biomasse était plus faible. Par contre, l'accumulation de Cd dans les dix premières minutes par ces plantes plus jeunes était plus rapide, indiquant une meilleure capacité de sorption de la part des plantes jeunes.

L'inoculation de luzernes par *G. intraradices*, cultivées en milieu simplifié, a permis de comparer la capacité de sorption de plantes âgées de 150 jours, mycorhizées ou non, et des hyphes récoltés. Le dosage du  $^{109}\text{Cd}$  dans ces hyphes a montré que le champignon avait une capacité de sorption similaire à celle des racines car les concentrations en radioactivité mesurées dans les racines et dans les hyphes étaient équivalentes. Néanmoins, les quantités totales de Cd sorbées par les plantes mycorhizées n'étaient pas significativement différentes des valeurs obtenues avec les plantes non mycorhizées. Ce résultat pourrait être lié à la faible quantité de mycélium, comparée à la biomasse racinaire, récoltée dans le compartiment du dispositif accessible uniquement aux hyphes. Ainsi, même si le mycélium est capable d'immobiliser de fortes concentrations en Cd, la quantité totale de Cd sorbée serait négligeable par rapport à celle immobilisée par les racines, ceci dans les conditions de l'expérience et sur un temps de contact court avec le cadmium en solution. Par ailleurs, *G.intraradices* (G.i. n°1) pourrait avoir des capacités de fixation de Cd plus faibles que *G.mosseae* P2, qui avait été utilisé dans les travaux de Joner et al (1997). Enfin, il serait nécessaire de tester des plantes plus jeunes. Dans des conditions où un inoculum fongique produirait plus de mycélium et aurait une capacité de sorption plus importante, l'absorption du Cd par la plante pourrait être influencée significativement. De plus, dans notre expérience,

le champignon n'a pas eu d'effet sur la biomasse de la plante. Un accroissement de la biomasse aurait alors certainement augmenté la quantité de Cd sorbée.

Par ailleurs, dans cette expérience, le cadmium était sous forme ionique en solution (majoritairement  $\text{Cd}^{2+}$ ) or, dans les sols, Cd peut former des complexes organiques ou inorganiques dont la sorption sur les racines et les hyphes peut être différente de  $\text{Cd}^{2+}$ .

#### IV. Expérience 4 : Accessibilité du champignon MA à différentes formes de Cd du sol.

##### Introduction/Objectif de l'expérience

L'utilisation d'un dispositif à compartiment dans l'expérience précédente a permis d'étudier la capacité de sorption du Cd par *G. intraradices* sur un temps court et dans un milieu simplifié où le cadmium était principalement sous forme ionique libre. Or, dans les sols, Cd est présent sous différentes formes plus ou moins disponibles selon les conditions physico-chimiques du sol. Le transfert de Cd à la plante dépend de la spéciation du métal en solution et dans la phase solide du sol. La plante peut aussi modifier la disponibilité de Cd dans la rhizosphère en exsudant des composés tels que des acides organiques qui extraient les éléments de la phase solide et augmentent leur mobilité. Les champignons MA sont-ils aussi capables de modifier leur environnement pour prélever et transporter le cadmium? Peu d'études sont disponibles sur les formes de métaux accessibles aux hyphes du champignon car il est difficile d'isoler et de cultiver des champignons MA sans plante. Les hyphes de champignons MA sont capables de transporter du Cd jusqu'à la plante (Joner et Leyval, 1997) mais on ne sait pas sous quelle(s) forme(s) il est prélevé.

L'objectif de cette dernière expérience était de déterminer si les hyphes extraracinaires d'un champignon MA sont capables de prélever et de transporter du Cd fixé sur différentes phases porteuses du sol. Pour cela, grâce à un dispositif à compartiment latéral, les hyphes du champignon avaient accès, pendant 1 mois de culture, à un compartiment contenant trois substrats contrastés (sable grossier, compost et la fraction argile-limon d'un sol) contaminés en Cd et marqués au Cd<sup>109</sup>. Des extractions chimiques séquentielles ont été réalisées pour évaluer la répartition du Cd sur les phases porteuses et déterminer les formes de Cd présentes. Le champignon MA a-t-il accès à ces différentes fractions de Cd ou seulement au Cd soluble-échangeable? La disponibilité du cadmium étant différente dans les trois substrats utilisés, une quantité différente de Cd<sup>109</sup> a été ajoutée dans les compartiments latéraux pour le sable par rapport au compost et à la fraction argile-limon.

Les propriétés des substrats étudiés étaient aussi très différentes et pouvaient influencer les capacités exploratrices du champignon MA. Le développement du réseau mycélien dans le sol peut influencer la séquestration des métaux, il était donc aussi nécessaire dans cette étude de mesurer la croissance des hyphes dans les différents substrats.

À soumettre

## **Accessibility to different cadmium soil fractions by arbuscular mycorrhiza and transfer to plants**

Paul-Olivier Redon, Thierry Béguiristain and Corinne Leyval

LIMOS, Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols, Nancy-University, CNRS ; Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex, France.

### **Abstract**

Cadmium (Cd) behaviour in soils and its transfer to plants is an important topic needing careful attention. The fractionation of this toxic metal in soils, as determined by various sequential extractions, varies widely according to soil physico-chemical conditions, influencing availability for plants and microorganisms. Microorganisms can modify Cd equilibrium in the rhizosphere, where a range of exudates and metabolites are produced, potentially affecting the chemical behaviour of Cd and plant uptake. Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are major actors of the rhizosphere which may take up and transport Cd from the soil solid phase to host plant. A compartmented pot culture was used to investigate whether AM external mycelium has access to soluble-exchangeable Cd only or also to other forms of Cd. In the experimental device, the fungal hyphae could grow in three contrasted substrates (coarse sand, compost and clay-loam) spiked with  $^{109}\text{Cd}$ . Hyphae transported more Cd to shoots when they were exposed to Cd-contaminated coarse sand, where Cd was mainly soluble-exchangeable and certainly in a free ion form ( $\text{Cd}^{2+}$ ). With compost and clay-loam, where Cd was more strongly bound to the solid phase, Cd plant uptake was lower and the presence of the fungus tended to immobilize Cd in the roots. This indicated that Cd uptake by hyphae involved mainly soluble forms of Cd. The AM influence on root to shoot Cd translocation seemed to differ with substrates and to be lower with compost and especially clay-loam than with sand. However, hyphal development in lateral compartments differed between substrates and was much lower in sand than in compost and clay-loam.

**Keywords** Arbuscular mycorrhiza, cadmium, Cd availability, compartmented device, sequential extraction procedure, soil

## Introduction

Among trace metals, cadmium (Cd) is a highly toxic element and its behaviour in soils and its transfer to biological organisms need careful attention to avoid food chain contamination. This metal was widely studied because of its acute toxicity (Sato, 2002), even at low concentrations, and also because it is relatively mobile in soil-plant systems (Prokop et al., 2003). Cd is easily transferred to plants growing in metal contaminated soils, leading to phytotoxicity and reducing crop yield, but also potentially contaminating the consumers. Total concentration is not a reliable indicator of metal bioavailability (Peijnenburg et al., 1997) because metal mobility and accessibility to organisms are controlled by complex chemical sorption mechanisms depending on soil physico-chemical conditions (pH, Eh, temperature, organic matter, mineralogy...). The binding energies of Cd on different soil constituents vary and influence Cd release in soil solution where it is easily available for plants and microorganisms. This solid – solution equilibrium of Cd in soils is predominantly ruled by soil pH and organic matter content (Krishnamurti and Naidu, 2003). Cd partitioning in soil, i.e. its association with different binding sites, can be determined by sequential chemical extractions. The principal forms of mobile and mobilisable trace metals in soil can be summarized as (Ross, 1994):

- in the soil solution: ionic, molecular, chelated and colloidal forms,
- at the exchange interface: readily exchangeable ions in organic or organic fractions,
- in adsorption complexes: more firmly bound ions,
- incorporated in precipitated oxides and insoluble salts,
- fixed in crystal lattices of secondary clay minerals.

Cadmium behaviour in soils is also strongly influenced by organisms. Plants and soil microorganisms may modify Cd equilibrium in soils and access Cd pools usually unavailable without action of living organisms (Sterckeman et al., 2005). Indeed, in the rhizosphere, root exudates and microbial metabolites, produced in large amounts, play a key role in the modification of Cd chemical behaviour (Krishnamurti et al., 2005). Plant roots produce a range of compounds (organic acids, protons, chelators...) which modify the surrounding soil. Such a modification of the soil matrix affects the access to nutrients and also the release of non-essential elements in the solution which can be absorbed by plants simultaneously. In turn, the roles of bacteria and fungi on metal solubilization or immobilization are not negligible (Gadd, 2004). On one hand, bacterial effects (dissolution, reduction, complexation)

on metal mobilization were shown in many studies (Quantin et al., 2001 ; Gadd et al., 2003). On the other hand, metal solubilization by fungi was reported for ericoid mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi as a result of an acidification of the medium (Fomina et al., 2005). The solubilization of a lead mineral (pyromorphite) by the pathogenic fungus *Aspergillus niger* (Sayer et al., 1999) or the ligninolytic capacity of ectomycorrhizal fungi potentially releasing organically bound metals are other examples of the solubilizing capacity of fungi. Concerning arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, solubilization of soil components is less documented maybe because they cannot be cultivated without a host plant and also because they seem to be rather involved in metal binding and immobilization (Galli et al., 1994 ; Janoušková et al., 2006). However, there is evidence of organic and inorganic phosphate solubilization (Koide and Kabir, 2000; Tawaraya et al., 2006) which may release metals precipitated with phosphate.

AM hyphae were shown to transport trace metals, like Cd (Joner and Leyval, 1997), and to increase the quantity of these non-essential elements transferred to plant (Redon et al., 2008). While most studies dealt with the plant – AM fungus dialogue, the influence of arbuscular mycorrhiza on metal release from the solid phase remains unclear. Whether the metal accumulation in plants via the mycelial net is linked to fungal transport of metals from the soluble-exchangeable pool only or if the AM fungi have access to other Cd forms needs to be elucidated. First, we need to know which forms of soil metals can be absorbed and transported by AM fungi. Using compartmented pots, the aim of the study was to assess the capability of AM fungi to transport Cd from different soil compartments. For that purpose, we used three different Cd-contaminated substrates, spiked with  $^{109}\text{Cd}$  and containing contrasted proportions of mobilisable and less mobilisable Cd forms.

## Materials and methods

### Selection and preparation of the Cd contaminated substrates

Three contrasted substrates (acid-washed coarse sand, a compost and a clay-loam soil fraction (<50  $\mu\text{m}$ )) were selected for their different Cd binding capacity evaluated by a single  $\text{CaCl}_2$  1 M extraction and by a sequential extraction procedure, adapted from Ahnstrom and Parker (1999).

Each substrate was mixed with 30% (v:v) fine sand and contaminated with Cd (as  $\text{CdSO}_4$ ). Based upon the results of the  $\text{CaCl}_2$  extraction (79% of total Cd was  $\text{CaCl}_2$

extractable in sand, 53% in compost and 54% in the clay-loam fraction), which was shown to reflect Cd availability (Young et al., 2000), the coarse sand received 6 mg Cd kg<sup>-1</sup> while the compost and the clay-loam soil fraction were contaminated at 9 mg Cd kg<sup>-1</sup>. These contaminated substrates were autoclaved twice and 10 mL kg<sup>-1</sup> of a 5µm-filtrated unsterilized soil suspension (50 g of dry soil in 500 mL NaCl 0.8%) was added to reinoculate the indigenous microflora of the soil free of AM fungal spores. The substrates were then aged for two weeks at room temperature.

#### Sequential extraction of Cd fractions in contaminated substrates

The sequential extraction, performed on 2.0 g dry samples experimentally contaminated with Cd (two repetitions per substrate), led to five operationally defined Cd fractions: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1 M (F1, “soluble-exchangeable Cd”); Na acetate 1 M, pH 5.0 (F2, “specifically sorbed-carbonate bound Cd”); 5% NaOCl, pH 8.5 (F3, “oxidizable Cd”); oxalic acid 0.2 M + NH<sub>4</sub> oxalate 0.2 M + ascorbic acid 0.1 M (F4, “reducible Cd”). According to the recommendation of Ahnstrom and Parker (1999), the different steps were repeated (twice for F1 and F2 and three times for F3 and F4) in order to extract completely Cd in each fraction. An alkaline fusion was performed to measure the total Cd contents in the substrates and the residual Cd fraction (F5) was calculated by difference between total Cd and Cd extracted in the four fractions.

#### Plant growth in compartmented system

Mycorrhizal (M) or non mycorrhizal (NM) barrel medics (*Medicago truncatula* Gaertn. line J5) were grown in pots with a single side arm (Joner & Leyval, 1997). The system was divided into a vertical root compartment (RC; 500 cm<sup>3</sup>) and a horizontal hyphal compartment (HC; 79 cm<sup>3</sup>) separated from RC by a 20 µm nylon mesh, allowing access to HC by extraradical mycelium only. One medic per pot was cultivated in the RC in a mix (665 g) of an autoclaved agricultural luvisol (silty clay loam) (59%), autoclaved coarse sand (30%) and autoclaved (NM) or not (M) fungal inoculum (11%). This mix of substrates was also reinoculated with the indigenous microflora of the soil free of AM fungal spores as described in the preparation of the Cd contaminated substrates. The inoculum was a lava-based substrate containing root fragments colonized by an AM fungus (*Glomus intraradices*) isolated from a metal contaminated soil and supplied by the Institut für Pflanzenkultur (Solkau, Germany).

Plants were first grown for three weeks under controlled conditions (16 h photoperiod, 22°C/18°C day/night, 400  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 70% relative humidity), then, the HC was filled with one Cd-contaminated substrate (coarse sand, compost or clay-loam soil fraction) and plants were harvested one month later. Soil and substrate characteristics are shown in table 1.

*Table 1: Characteristics of the agricultural soil and of the substrates used in the experiment before dilution with sand. RC: Root compartment; HC: Hyphal compartment.*

	Luvisol	Compost	Clay-loam fraction	Coarse sand
Localization	RC	HC	HC	HC
Granulometry	30% < 2 $\mu\text{m}$	19% < 2 $\mu\text{m}$		
	57% 2 - 50 $\mu\text{m}$	22% 2 - 50 $\mu\text{m}$	< 50 $\mu\text{m}$	> 500 $\mu\text{m}$
	13% > 50 $\mu\text{m}$	59% > 50 $\mu\text{m}$		
pH (H <sub>2</sub> O)	7.4	7.9	8.0	6.6
Organic C (g kg <sup>-1</sup> )	16.0	186	8.7	ND
Total N (g kg <sup>-1</sup> )	1.7	13.2	0.9	ND
CEC (cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> )	14.9	26.9	8.4	ND
P (Olsen) (mg kg <sup>-1</sup> )	117	902	80	ND

Substrate in HC consisted of two layers; first a 14 mm buffer layer (uncontaminated substrate) closest to the 20  $\mu\text{m}$  nylon mesh, then a 18 mm layer containing the Cd contaminated substrate labelled with <sup>109</sup>Cd (1470 kBq in compost and clay-loam fraction, 1000 kBq in coarse sand), leading to the following specific activities: 116144, 202061 and 153846 dpm  $\mu\text{g}^{-1}$  Cd in sand, compost and clay-loam, respectively. Layers were separated by a disk of 1 mm nylon mesh to ease separation during harvest. Treatments were done in triplicates.

#### Harvest and analyses

Plants were harvested 60 days after sowing (36 days after insertion of the hyphal compartment). Shoots were cut and roots were rinsed in 2 L of distilled water and in 500 mL of CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM to remove Cd adsorbed on root surface. Subsamples of roots were taken to determine mycorrhizal colonization by Trypan blue staining as described by Koske and

Gemma (1989) and notation was performed using Trouvelot et al. (1986) method. Shoots and remaining roots were oven dried at 60°C and dry weights were recorded. The activity of  $^{109}\text{Cd}$  in shoots and roots was measured by  $\gamma$ -counting (Wallac 1480 Wizard<sup>®</sup> 3 gamma counter). Hyphae in HC were extracted from 2.0 g of fresh substrate from the buffer layer suspended in 250 mL of ultra pure water (modified after Miller et al., 1995). A 5 mL aliquot of the suspension was filtered on a 25 mm diameter nylon filter (porosity 1.2  $\mu\text{m}$ ). The filter was stained by Trypan blue, rinsed with distilled water and air dried. Filters were mounted on slides and hyphal length was measured under microscope by a filter-grid intersect method (Jakobsen et al., 1992).

### Statistical analysis

The R software was used for two-way ANOVA analyses to assess differences between treatments and for simple linear regressions.

## Results

### Cd fractionation in the contaminated substrates

The results of the sequential extraction of Cd performed on the three contaminated substrates are summarized in figure 1. Exchangeable Cd represented 71% of total Cd in coarse sand and only 5% and 3% in compost and clay-loam fraction, respectively. Cd was mostly bound to carbonates in compost and clay-loam fraction (44% and 77% respectively). A non-negligible amount of Cd bound to organic matter (F3 = 19%) was found in compost. 7% (sand) to 19% (compost) of Cd was associated to oxydes (F4). Compost contained 16% of residual Cd (F5) while, in coarse sand and in clay-loam, 100% of Cd was extracted in fractions F1 to F4. The sequential extraction procedure was performed in duplicate and very little variations were observed between the two repetitions (data not shown).

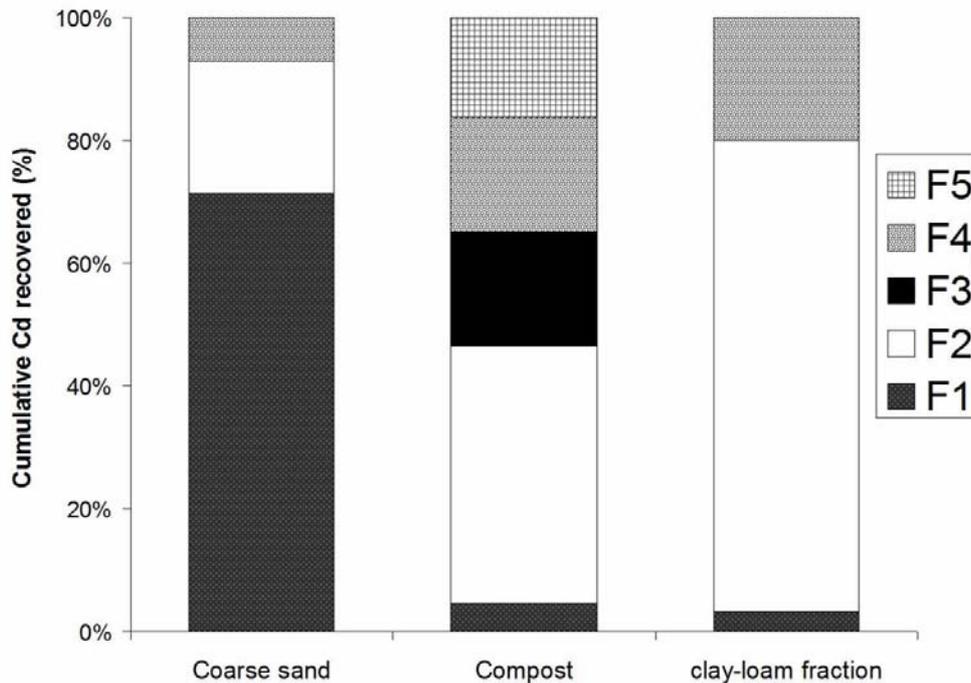


Figure 1: Relative Cd distribution in three contaminated substrates assessed by sequential extraction procedure. F1: “soluble-exchangeable”; F2: “sorbed-carbonate”; F3: “oxidizable”; F4: “reducible”; F5: “residual”.

#### Plant biomass, root colonization and hyphal length

Shoot and root dry weights were not significantly different between HC treatments (Table 2). However, the mean shoot dry weight of mycorrhizal plants ( $0.84 \pm 0.25$  g) was significantly higher ( $p < 0.01$ ) than non mycorrhizal plants ( $0.47 \pm 0.20$  g), while mean root dry weight was not significantly different ( $p = 0.13$ ) between M ( $0.13 \pm 0.06$  g) and NM ( $0.09 \pm 0.04$  g) treatments. Around 30 to 40% of roots were colonized by the AM fungus in M pots whereas NM treatments were not colonized (Table 2). AM root colonization tended to be lower in treatments with clay-loam in side compartments than in the others, but the difference was not significant. The length of hyphae extracted in the buffer layer of HC of mycorrhizal pots was very low in coarse sand, bigger in compost, and the highest in the clay-loam fraction (Figure 3). In addition, juvenile spores were observed in sand but not in compost and clay-loam.

*Table 2: Shoot and root dry weights and parameters of root colonization of mycorrhizal (M) and non mycorrhizal (NM) Medicago truncatula grown in compartmented pots with different Cd-contaminated substrates in hyphal compartment (HC). F% = frequency of mycorrhiza in the root system, M% = intensity of mycorrhizal colonization in the root system, A% = abundance of arbuscule in the root system. Effects of substrate and mycorrhizal treatments on shoot and root dry weights were assessed by two-way ANOVA analysis (data were log-transformed). ns = not significantly different, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .*

Substrate in HC	M status	Shoot	Root	Mycorrhizal colonization		
		g	g	F%	M%	A%
Coarse sand	M	0.78 ± 0.24	0.12 ± 0.05	37 ± 40	13 ± 12	7 ± 6
	NM	0.58 ± 0.24	0.12 ± 0.03	0	0	0
Compost	M	0.97 ± 0.25	0.16 ± 0.09	34 ± 27	7 ± 6	3 ± 2
	NM	0.46 ± 0.27	0.09 ± 0.05	0	0	0
Clay-loam fraction	M	0.77 ± 0.30	0.11 ± 0.04	11 ± 13	1 ± 2	0.4 ± 0.8
	NM	0.38 ± 0.05	0.06 ± 0.01	0	0	0
Factor		F-ratios/Significance				
Mycorrhiza		10.7 **	2.5 ns			
Substrate		0.6 ns	1.0 ns			
Mycorrhiza x Substrate		0.7 ns	0.8 ns			

### Radioactivity transferred to plants

The quantities of  $^{109}\text{Cd}$  transferred to shoots and roots were calculated (Table 3) and were significantly different according to the Cd-contaminated substrate placed in HC, they followed the order: coarse sand > compost > clay-loam.  $^{109}\text{Cd}$  contents in shoots were significantly affected by the mycorrhizal status: more  $^{109}\text{Cd}$  was transferred to shoots of mycorrhizal plants than non-mycorrhizal plants. The percentage of the AM increased Cd quantity ( $100 \times (\text{quantity in M plants} - \text{quantity in NM plants}) / \text{quantity in NM plants}$ ) in roots was higher with compost (874%) than with clay-loam (441 %) and than with sand (148%) (Figure 3). However, results differed with Cd in shoots where the highest increased percentage due to AM was obtained with sand (1000%), then with compost (614 %) and the lowest with clay-loam (119%). Such increase in shoot Cd uptake may correspond to the increased shoot biomass by AM inoculation with clay-loam in HC (100%) (Table 2), but not in the other treatments. The root/shoot ratio of the  $^{109}\text{Cd}$  quantity transferred was higher with

compost in HC than with coarse sand and clay-loam, but no significant differences were observed between M and NM treatments.

*Table 3: Quantity of  $^{109}\text{Cd}$  (cpm) transferred in shoots and roots of mycorrhizal (M) and non mycorrhizal (NM) *Medicago truncatula* grown in compartmented pots with different Cd-contaminated substrates in hyphal compartment (HC). Effects of substrate and mycorrhizal treatments were assessed by two-way ANOVA analysis (data were log-transformed when necessary). ns = not significantly different,  $\cdot p < 0.1$ ,  $* p < 0.05$ ,  $** p < 0.01$ ,  $*** p < 0.001$ .*

Substrate in HC	M status	Shoot	Root	Root/Shoot
		cpm	cpm	
Coarse sand	M	38996 ± 36827	45863 ± 2075	2.2 ± 2.1
	NM <sup>a</sup>	3508	18505	5.3
Compost	M	857 ± 1267	20953 ± 34343	14.2 ± 10.5
	NM	120 ± 120	2150 ± 2726	13.2 ± 9.6
Clay-loam fraction	M	14 ± 11	86 ± 127	3.9 ± 4.1
	NM	6.4 ± 0.3	15.9 ± 1.1	2.5 ± 0.2
Factor		F-ratios/Significance		
Mycorrhiza		9.9 *	3.9 $\cdot$	0.05 ns
Substrate		41.3 ***	20.5 ***	4.1 $\cdot$
Mycorrhiza x Substrate		0.4 ns	0.05 ns	0.1 ns

<sup>a</sup>: No replicates

The simple linear regressions between  $^{109}\text{Cd}$  concentration in M and NM plants and  $^{109}\text{Cd}$  concentrations in the different fractions of the sequential extraction showed a positive relationship between radioactivity in shoots and radioactivity in the exchangeable fraction (F1) (Figure 2a). However, the regressions were different between M and NM treatments, the slope was higher when the fungus was present (M) than when only diffusion through the nylon mesh occurred (NM). Root  $^{109}\text{Cd}$  concentration was quite well related to  $^{109}\text{Cd}$  concentrations in F1 in NM treatments, but not in M treatments. On the contrary, a negative relationship was observed between shoot  $^{109}\text{Cd}$  concentration and  $^{109}\text{Cd}$  concentration in F2 (carbonate bound Cd) but this relationship was less significant ( $R^2 = 0.8$ ) (data not shown).

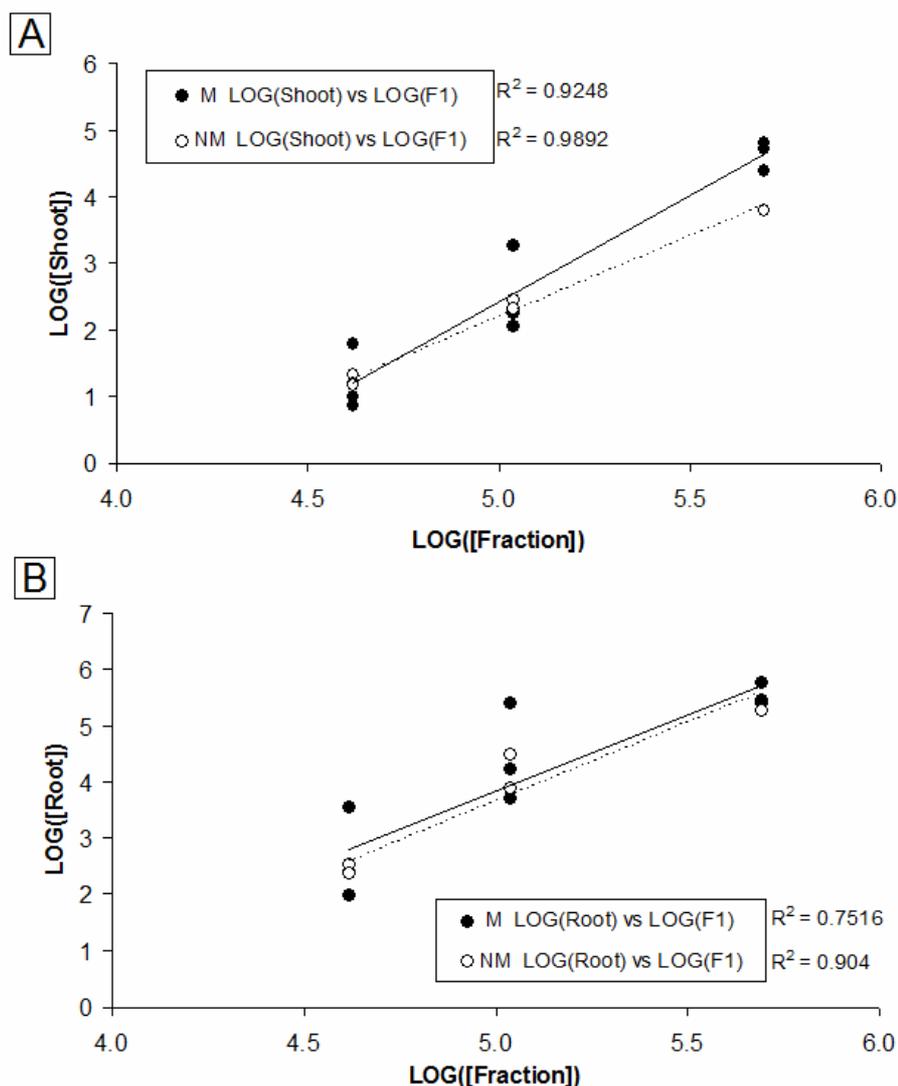


Figure 2: Relationships between the concentrations of  $^{109}\text{Cd}$  ( $\text{cpm g}^{-1}$ ) in shoots (A) and roots (B), of mycorrhizal (M) and non mycorrhizal (NM) *Medicago truncatula*, and the concentrations of  $^{109}\text{Cd}$  in fraction F1 (soluble-exchangeable Cd) of the sequential extraction (values were log-transformed).

## Discussion

AM hyphae were exposed to three different Cd contaminated substrates in compartmented pots to assess the ability of the fungus to transport Cd to plant as a function of Cd availability and soil fractions. The sequential extraction procedure showed that the three substrates were well contrasted and contained three different Cd forms. In coarse sand, most Cd was “soluble-exchangeable”, i.e. weakly bound to the solid phase. It can be hypothesized that, in sand (which was thoroughly washed), Cd was predominantly in ionic form ( $\text{Cd}^{2+}$ ). In compost, Cd was mostly bound to carbonates and also to organic matter and a small

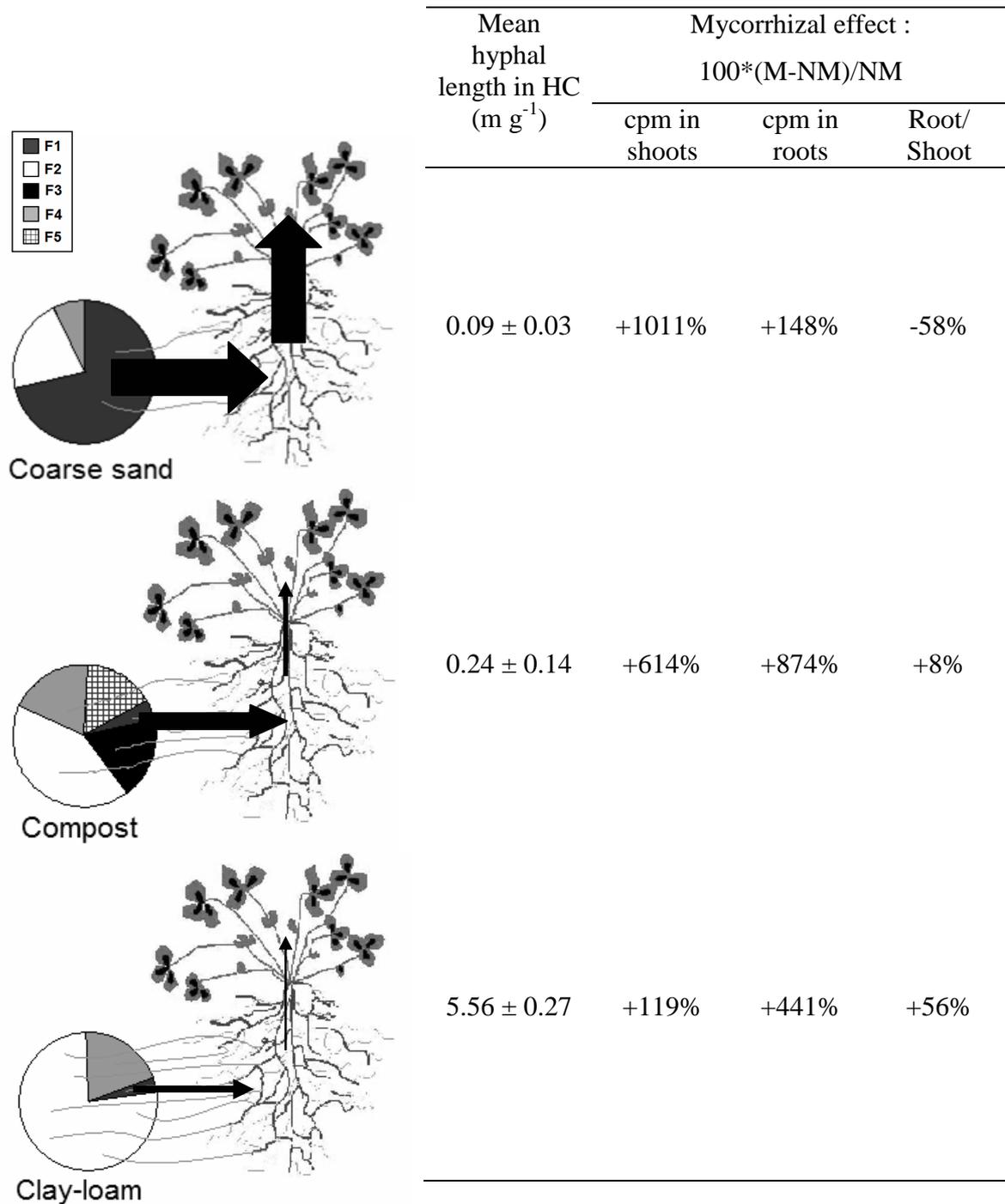


Figure 3: Schematic representation of Cd uptake from three contrasted substrates by AM hyphae colonizing *Medicago truncatula*, mean hyphal length in the hyphal compartment (HC) and mycorrhizal effect ((M-NM/NM)\*100) on <sup>109</sup>Cd total content in shoots and roots and on Root/Shoot ratio. Relative Cd distribution in the three contaminated substrates placed in HC was assessed by sequential extraction. F1: “soluble-exchangeable”; F2: “sorbed-carbonate”; F3: “oxidizable”; F4: “reducible”; F5: “residual”. Arrows represent the quantities of <sup>109</sup>Cd transferred to roots and shoots by AM mycelium.

percentage was soluble-exchangeable. Cd was more strongly bound to the solid matrix than in sand. Given a high concentration of organic C in compost, presence of Cd under soluble organic complexes can be assumed (Krishnamurti and Naidu, 2003). Cd was the less exchangeable in clay-loam where it was mainly sorbed to carbonates. Due to small pore size and to a low extractability (2-fold lower than in compost), Cd binding to the solid phase was very strong in clay-loam.

As compared to the  $\text{CaCl}_2$  extractable pool of Cd,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1M (Fraction F1 of the sequential extraction) extracted less Cd, especially in compost and clay-loam.  $\text{Ca}^{2+}$  can easily substitute  $\text{Cd}^{2+}$  in calcite and inversely (McBride, 1994), thus Cd bound to carbonates may have been extracted by  $\text{CaCl}_2$  but not by  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Some Cd was transferred to shoots and roots in NM treatments despite the use of a non-contaminated buffer layer. This was due to diffusion (mass flow) through the nylon mesh as often observed in studies using side-arm compartmented devices (Joner and Leyval, 1997). Cd transferred by this way was very well correlated to Cd concentration in fraction F1, showing that  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1M was a good indicator of Cd phytoavailability.

AM hyphae were able to transport Cd to plants and they mainly took up exchangeable Cd, i.e. the most mobile form, as shown by the highest quantities of Cd transferred to shoots and roots when the fungus had access to Cd contaminated sand. This labile form of Cd, transported by the fungus and by mass flow, was easily translocated to shoots. Cd uptake by hyphae was lower in soil conditions where Cd was more strongly bound to the solid phase (compost and clay-loam). However, mycorrhizal inoculation affected Cd sequestration in roots and root to shoot translocation, and it depended on the Cd binding matrix (Figure 3). In sand, Cd was predominantly soluble-exchangeable and the mycorrhizal effect ( $100 \times (\text{M-NM})/\text{NM}$ ) on Cd transfer to shoots was higher than in the two other substrates. In compost and in clay-loam, where a few percents of Cd was exchangeable, the fungus tended to reduce Cd translocation to shoots by sequestering more Cd in roots. This relative increase of Cd uptake in roots due to AM with compost and clay-loam suggested different Cd accessibility to AM hyphae in the former substrates than in sand. Extraradical mycelium was shown to solubilize carbonate-bound Cd (Giasson et al., 2005) in axenic medium by releasing organic acids. If such mechanism occurred in our more complex soil-plant system, the consequent uptake by AM hyphae might be very low (and negligible) as compared to the preferential uptake of soluble-exchangeable Cd.

However, the root/shoot pattern of Cd accumulation in plants seemed to be different according to the Cd forms in soils. In compost, Cd was more immobilized in roots than with

the two other substrates and root sequestration was slightly enhanced by the AM fungus. Joner and Leyval (1997) showed higher  $^{109}\text{Cd}$  root/shoot ratios in mycorrhizal plants underlying an immobilization of Cd by mycorrhizal roots. Such Cd immobilization in mycorrhizal roots tended to be observed with compost and clay-loam in HC but not with sand. This suggests that Cd sequestration in mycorrhizal roots depends on its speciation in soil. Free  $\text{Cd}^{2+}$  might be more easily translocated to shoots while complexed forms of Cd may be sequestered in roots and AM mycelium. Cd stabilization by phosphate in vacuoles of hyphae and roots was shown in previous studies (Turnau et al., 1993; González-Guerrero et al., 2008). So, relatively high levels of P in contaminated substrates may have increased Cd storage in vacuoles and thus immobilization in roots.

The growth of AM hyphae in HC varied widely among treatments. The maximum hyphal length was measured in clay-loam while it was lower in compost and minimum in sand. Hyphal length was shown to be higher in soil than in sand (Drew et al., 2003), with pore size influencing hyphal morphology. Differences in aeration and moisture of the media due to differences in granulometry and pore size between the three substrates may have influenced the fungal expansion. Nutrient availability and metal toxicity could also have affected hyphal length as few hyphae colonized sand which was poor in nutrients and contained highly available Cd. Compost and clay-loam were more suitable for external mycelium maybe because they contained nutrients which may have stimulated hyphal exploration. Nevertheless, hyphal length was lower in compost than in clay-loam maybe because compost contained a high level of P which was shown to affect AM colonization (Peters and Habte, 2001; Hao et al., 2008).

No correlation between P acquisition and production of external hyphae was found by Drew et al. (2003), which is in accordance with our results concerning Cd uptake. Either for essential or non-essential elements, Cd transport by hyphae to roots thus did not depend on hyphal length and seemed to be more closely related to element mobility. Indeed, hyphal length in HC was not the major parameter influencing Cd transfer to plants as higher plant concentrations were observed with sand, where Cd mobility was high and where few hyphae grew. It was the contrary with hyphae exposed to contaminated clay-loam. It can be hypothesized that a dense mycelial net also reduces metal mobility in soil through sorption mechanisms and sequestration by the glomalin released by fungi in the medium (González-Chávez et al., 2004).

In conclusion, the results suggested that *G. intraradices* was able to transport predominantly soluble-exchangeable Cd to plants and was acting as a root extension.

However, root to shoot Cd ratio differed between substrates suggesting different sequestration mechanisms by AM hyphae. Furthermore, hyphal development and exploration of the soil volume were affected by soil properties, but Cd transfer to plants was not directly related to hyphal length.

### **Acknowledgements**

Authors would like to thank Vivienne Gianinazzi-Pearson (INRA Dijon) for providing seeds of *M. truncatula* and Stéphane Colin (INPL Vandoeuvre-lès-Nancy, France) for technical help on  $\gamma$ -counting.

## Principaux résultats

La capacité du champignon MA à prélever et à transporter le cadmium jusqu'à la plante dans le dispositif à compartiment utilisé était dépendante des phases porteuses de Cd dans le sol. Il faut noter la grande variabilité dans les résultats obtenus. Toutefois, la quantité de radioactivité mesurée dans la plante, en particulier dans les parties aériennes, était positivement corrélée à la quantité de Cd soluble-échangeable dans les trois substrats étudiés. Par rapport au traitement non mycorhizé (NM), la présence du champignon MA a fortement augmenté la quantité de Cd transférée aux parties aériennes lorsqu'il était exposé au sable contaminé. Dans ce substrat, Cd était majoritairement soluble-échangeable et certainement sous forme ionique libre ( $\text{Cd}^{2+}$ ). Par contre, avec le compost et la fraction limon-argile moins de Cd a été prélevé et transporté vers la plante par le champignon. Ceci suggère que *G. intraradices* a principalement absorbé et transporté vers la plante la fraction soluble-échangeable du cadmium, qui était beaucoup plus faible avec le compost et la fraction limon-argile qu'avec le sable. De plus, la quantité totale de radioactivité prélevée par le champignon et finalement exportée vers la plante était beaucoup plus faible que la quantité de radioactivité soluble-échangeable (F1) présente dans chacun des substrats. Par rapport au traitement NM, Cd s'est plus accumulé dans les racines que dans les parties aériennes des plantes mycorhizées, ce qui s'accorde avec les résultats obtenus précédemment (Joner et Leyval, 1997). Le mycélium extraracinaire pourrait donc transporter le Cd vers les racines et l'accumuler sous une forme moins transférable vers les parties aériennes.

Par ailleurs, le champignon MA ne semble pas être capable de mobiliser des quantités significatives de Cd à partir des formes assez fortement liées à la phase solide car avec la fraction limon-argile de sol, dominée par des formes carbonatées du Cd, le champignon n'a pas beaucoup augmenté la quantité de Cd transférée à la plante par rapport à la simple diffusion qui a eu lieu dans les traitements NM. En présence de matière organique (dans le compost), la colonisation par le champignon MA a eu tendance à améliorer davantage le transfert de Cd vers les racines qu'avec les autres substrats.

Enfin, le champignon MA n'était pas capable de coloniser tous les substrats de la même manière et semble avoir des conditions édaphiques préférentielles. Ainsi, une très faible longueur d'hyphes et des spores ont été observées dans le sable alors que plus d'hyphes étaient présentes dans le compost et que c'est dans la fraction limon-argile que le champignon

s'était le mieux développé. La porosité du milieu (aération, teneur en eau), la disponibilité en éléments minéraux, la teneur en phosphore ou la toxicité métallique sont autant de caractéristiques susceptibles d'influencer le bon développement des hyphes dans le milieu.

## **Partie 4**

# **Discussion générale & Perspectives**



## Discussion générale et perspectives

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (MA) sont très fréquemment présents dans les sols, établissant une symbiose avec la majorité des plantes herbacées. Ce sont donc des acteurs inévitables du fonctionnement des systèmes sol-plante que l'on trouve également dans les sols contaminés par les ETM. Parmi les ETM, le cadmium (Cd) est un élément toxique dont le transfert aux plantes doit être rigoureusement surveillé. La modélisation de ce transfert et la quantification du Cd exporté dans la plante sont en effet des enjeux importants. La contribution des microorganismes dans le transfert et en particulier celui des champignons MA, microorganismes en relation directe avec le sol et la plante, mériteraient d'être pris en compte dans l'élaboration des modèles de transfert. De plus, il peut être envisagé d'utiliser des isolats sélectionnés de champignons MA comme agents biologiques en phytoremédiation.

Dans ce travail, l'étude de l'influence des champignons MA a été abordée par une approche globale pour déterminer si ces champignons symbiotiques ont un effet sur le bilan de Cd dans le système sol-plante. Il s'agissait de déterminer à quels niveaux du système l'action d'un champignon est la plus déterminante et si celle-ci peut être quantifiée. Le transfert de Cd dans le système sol-plante-champignon peut être influencé à différents niveaux :

- soit directement par la plante; le prélèvement par les racines étant dépendant, d'une part, de la physiologie et de la biomasse de la plante, d'autre part, de la modification de l'équilibre chimique de Cd dans le sol par les exsudations racinaires.
- soit directement par le champignon; le mycélium extraracinaire pouvant prélever, transporter et immobiliser Cd (sorption par la paroi fongique, stockage dans les structures internes, production de glomaline), ou modifier l'équilibre chimique de Cd.
- soit indirectement par le champignon via une action sur la plante et les autres microorganismes.

## **1. Influence indirecte des champignons MA sur le transfert de Cd et variabilité de l'effet mycorhizien.**

Les résultats des expériences en pot (Expériences 1 et 2) montrent que les effets de l'inoculation mycorhizienne dépendent des conditions du sol et de l'origine et du comportement des isolats fongiques.

Le transfert de Cd dans les plantes mycorhizées ou non dépend de la mobilité du métal dans le sol qui est principalement dépendante du pH. Le prélèvement de Cd directement par la plante est ainsi influencé par sa disponibilité dans le sol, mais aussi par la physiologie et la croissance de la plante, variable selon le stress (métallique et/ou nutritif) imposé à la plante. Par contre, l'effet protecteur du champignon (augmentation de la biomasse végétale, diminution de la concentration en Cd dans la plante) ne dépend pas uniquement de la disponibilité des métaux, mais aussi du type de pollution (présence de plusieurs métaux ou non) et de son effet toxique sur le développement de la plante. Ainsi, l'effet du champignon étudié (G.i. n°1) sur le bilan de Cd, allant jusqu'à doubler la quantité de Cd dans les parties aériennes et à réduire de 20% la quantité de Cd transférée dans les percolats, serait un effet indirect lié à l'augmentation de la biomasse végétale.

Ceci a été confirmé dans l'expérience 2 qui a montré que tous les isolats de champignons n'agissent pas de la même manière en réponse à une contamination métallique, mettant en évidence la complexité du rôle des mycorhizes. Si parmi les cinq champignons utilisés dans ce travail, quatre ont stimulé la croissance de la luzerne, seuls deux isolats ont conduit à une diminution de la concentration en Cd dans les parties aériennes de la luzerne. Le champignon MA utilisé dans toute la thèse (G.i. n°1) a fortement augmenté la croissance de la plante hôte ce qui est peut-être associé à la stimulation des bactéries nodulantes du sol (Figure 13). Une telle interaction champignon-bactérie était particulièrement remarquable car elle a eu un impact important sur le bilan de cadmium, réduisant la concentration dans les parties aériennes et augmentant la quantité totale exportée, qui n'a pas été observé avec les autres souches de champignons. Cet isolat de *Glomus intraradices* provenait d'un sol fortement contaminé par les métaux alors qu'un autre isolat de la même espèce, mais isolé d'un sol non contaminé, n'a pas présenté le même effet sur la biomasse et tendait même à diminuer la biomasse de la plante, pour un niveau de colonisation similaire. L'origine du champignon serait donc déterminante quant à son influence sur la croissance de la plante et

ainsi indirectement sur le transfert de Cd, mais aussi quant à la capacité de son mycélium à immobiliser les métaux. Certains isolats, tels que *G. mosseae* P2 ou G.i. n°1, pourraient en effet avoir une capacité de fixation plus importante que d'autres et entraîneraient une baisse de la concentration en métal dans les parties aériennes de la plante. Cette baisse des concentrations en métaux dans les parties aériennes des plantes mycorhizées est bénéfique pour le développement de la plante car elle réduit les dysfonctionnements cellulaires causés par les métaux et est aussi intéressante d'un point de vue sanitaire.

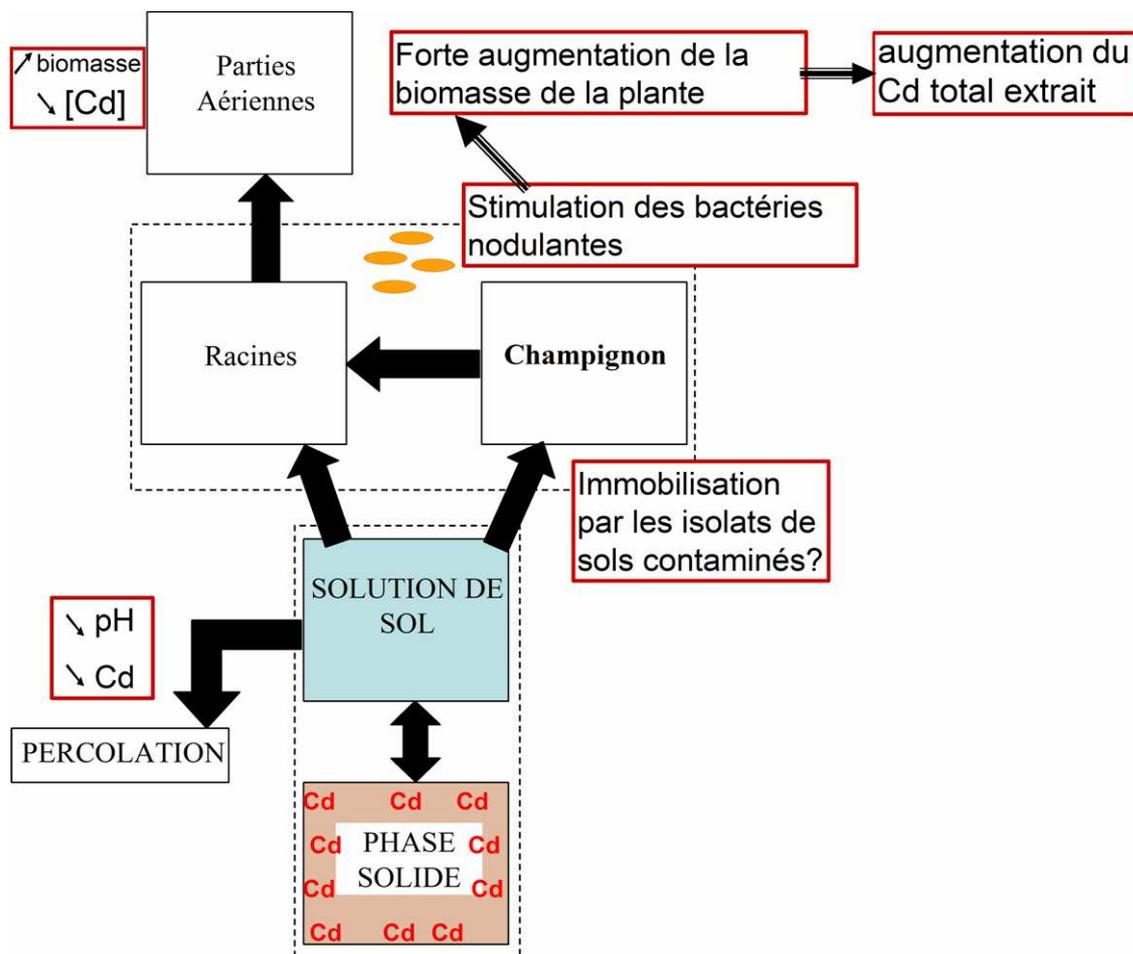


Figure 13 : Influences globales de l'inoculation d'un champignon MA dans le système sol-plante en présence de concentrations élevées d'ETM. Les flèches noires pleines représentent les transferts de cadmium entre les composantes du système.

Par ailleurs, l'intensité de la colonisation mycorhizienne, mesurée au moment de la récolte, ne semble pas refléter l'intensité de l'effet du champignon sur la croissance de la plante et sur le bilan de Cd. En fonction des résultats des deux premières expériences, la contribution des champignons MA au transfert de Cd dans des sols agricoles à pollution multi métallique pourrait être quantifiée comme suit :

- parmi les champignons utilisés, lorsque l'isolat fongique n'a pas stimulé de bactéries nodulantes : la masse sèche des parties aériennes a été augmentée de 20% dans 3 cas sur 4.
- lorsque l'isolat fongique était adapté à une contamination métallique : la concentration en Cd dans les parties aériennes a été réduite de 20%.
- lorsque l'isolat fongique a stimulé des bactéries nodulantes : la biomasse aérienne de la plante a été multipliée par 2 ou 3 et la quantité totale de Cd exportée dans les parties aériennes a été doublée bien que leur concentration en Cd ait diminué de 40%.

De plus, dans la gamme de concentrations en ETM étudiée, le transfert de Zn était influencé de la même manière que le Cd par le champignon MA, même si les différences sont moins significatives dans l'expérience 2. La mobilité de ces deux métaux serait ainsi sujette aux mêmes mécanismes et l'influence des champignons MA ne serait pas spécifique à un élément particulier.

Les deux expériences effectuées ont aussi permis de vérifier si la mycorhization peut influencer la quantité de Cd qui percole dans le sol. A différents moments des cultures, des percolations ont ainsi été provoquées en arrosant les pots à saturation, comme cela peut se produire dans la nature lors de fortes pluies. Dans les pots mycorhizés, la quantité de Cd percolée était alors plus faible que dans les pots non mycorhizés en particulier avec l'inoculation de G.i. n°1, certainement grâce à une plus forte biomasse végétale. Ce résultat souligne l'importance des champignons MA pour réduire la dissémination des ETM dans les eaux souterraines et donc la contamination de l'environnement à une plus large échelle.

Néanmoins, dans ces deux premières expériences les effets directs du champignon ne pouvaient pas être étudiés car ils n'étaient pas séparés de l'effet des racines de la plante. Pour mesurer les capacités de sorption et de transport des hyphes extraracinaires il était alors indispensable d'utiliser des dispositifs à compartiment.

## 2. Effets directs du champignon MA sur le transfert de Cd.

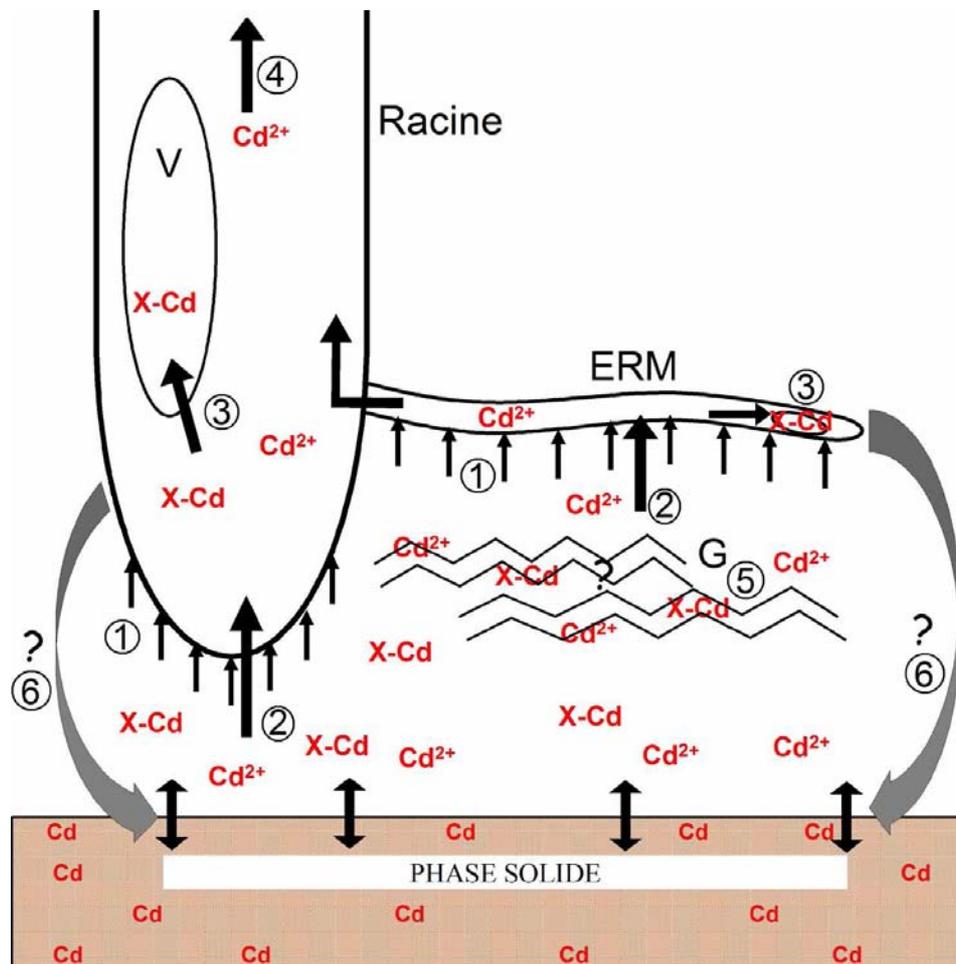


Figure 14 : Mécanismes possibles de prélèvement et transport du cadmium par une racine mycorhizée. ERM : mycélium extraracinaire. V : vacuole. G : glomaline (glycoprotéines d'origine mycorhizienne). X-Cd : complexes (organiques ou inorganiques) de Cd solubles. 1 : Sorption de Cd sur les parois des cellules racinaires et fongiques. 2 : Prélèvement du Cd (complexé et libre) et transport par voie symplasmique ou apoplasmique. 3 : Stockage de Cd sous forme complexée dans les vacuoles des cellules racinaires ou fongiques. 4 : Translocation du Cd libre vers les parties aériennes. 5 : Séquestration du Cd dans le sol par des glycoprotéines d'origine fongique. 6 : Exsudation de composés chimiques modifiant l'équilibre de sorption-désorption du Cd dans le sol.

Que ce soit à court (24 h) ou à plus long terme (30 j), la capacité de prélèvement de Cd du champignon a été estimée grâce à l'utilisation de dispositifs à compartiment qui permettent d'isoler du mycélium extraracinaire des racines. Les travaux antérieurs de Joner et Leyval (1997) et Joner et al. (2000) avaient montré que le mycélium d'un champignon MA (*Glomus*

*mosseae* P2) est capable de transporter Cd du sol à la plante et d'immobiliser le métal dans le système racinaire. Cet isolat P2 de *G. mosseae* a une forte capacité de sorption du Cd qui pourrait être expliquée par son origine d'un sol fortement contaminé en ETM. Les deux expériences réalisées en dispositif à compartiment ont été réalisées avec un isolat de *Glomus intraradices* (G.i. n°1), provenant également d'un sol riche en métaux lourds. L'étude de la sorption du Cd à court terme (expérience 3) a montré que, dans les conditions de l'expérience, les hyphes de *G. intraradices* ont une capacité de sorption similaire à celle des racines mais inférieure à celle de *G. mosseae* P2. Une telle différence de sorption pourrait être due aux conditions expérimentales différentes employées pour tester la sorption des deux champignons ou peut-être aussi au fait que la culture de cet isolat de *G. mosseae* est maintenue dans son milieu d'origine contaminé en métaux, alors que ce n'est pas le cas pour *G. intraradices*. Néanmoins, la culture à plus long terme en présence de différentes formes de cadmium dans le compartiment accessible aux hyphes a confirmé le prélèvement et le transport de Cd par les hyphes de *G. intraradices* (G.i. n°1) et une relative capacité à l'immobiliser dans les racines en fonction des formes de Cd présentes (expérience 4). Cette différence de comportement en présence de métaux selon l'isolat fongique étudié montre encore une fois la complexité de l'influence de ces microorganismes symbiotiques.

Si l'on regarde les capacités de sorption en 24 h de plantes mycorhizées et non mycorhizées (expérience 3), avec l'isolat mycorhizien utilisé et dans les conditions de l'étude (très simplifiées et différentes de celles d'un sol), l'effet direct à court terme du champignon sur le transfert de Cd à la plante semble être négligeable par rapport à l'effet racinaire. Par contre, dans un sol et à plus long terme (expérience 4), le mycélium extraracinaire joue le rôle d'extension du système racinaire en transportant le métal, principalement sous forme soluble-échangeable (Figure 14), et en explorant des endroits du sol où les racines de la plante sont absentes. Les résultats obtenus n'ont par ailleurs pas permis de répondre avec précision à la question des formes de Cd prélevées par les hyphes fongiques et les racines et de leur accumulation dans le système racinaire à cause de l'effet confondant des substrats contaminés sur la colonisation des hyphes. En effet, les longueurs d'hyphes mesurées dans les substrats étudiés (sable, compost ou limon-argile) étaient variables car certains substrats sont des milieux plus favorables au développement du mycélium extraracinaire que d'autres. Ainsi les hyphes du champignon avaient du mal à croître dans le sable alors qu'ils se développaient bien dans la fraction fine de sol. De plus, cette colonisation du milieu par les hyphes n'était pas proportionnelle au pourcentage de racines colonisées par le champignon. La colonisation

du système racinaire et du milieu par le champignon n'étant ainsi pas forcément dépendant l'un de l'autre, on peut se demander ce qui est le plus important pour le transfert des ETM : un champignon qui colonise bien les racines de la plante hôte ou un champignon dont le réseau mycélien est bien développé dans le sol ? Le mycélium extraracinaire produit-il aussi des composés (tels que la glomaline) capables d'immobiliser les métaux ?

### 3. Discussion sur les objets de l'étude

Les gammes de concentrations en Cd totales et extractibles dans les sols étudiés (Cd total de 4 à 9 mg kg<sup>-1</sup> ; Cd extractible au NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> de 0,2 à 1,7 mg kg<sup>-1</sup>) ne sont pas extrêmement élevées mais ce sont des teneurs qui dépassent les valeurs réglementées dans les sols et les plantes, et qui peuvent être rencontrées plus fréquemment que les très fortes concentrations trouvées dans les sols de friches industrielles ou de mines. Nos travaux concernent en effet des sols agricoles dont les concentrations en polluants doivent néanmoins faire l'objet d'une surveillance particulière. Par ailleurs, de tels sols reçoivent souvent divers amendements et engrais pour améliorer la croissance des plantes, mais qui peuvent limiter le rôle des champignons MA. En particulier, ces sols sont peu limitants en phosphore et donc le rôle des champignons MA dans la nutrition de la plante y est moindre, comme en témoignent les plus faibles concentrations en P mesurées au cours des différentes expériences dans les plantes mycorhizées par rapport aux plantes non mycorhizées. Malgré cela, les concentrations en Cd étudiées et la présence d'autres métaux lourds (Zn et Pb) constituent un stress pour la plante et l'inoculation par un champignon MA était dans la plupart des cas bénéfique à la croissance végétale (augmentation de la biomasse et, pour certains champignons, baisse des concentrations en ETM dans les tissus végétaux). La colonisation des plantes par les champignons MA dans des sols agricoles contaminés en ETM aurait ainsi un effet protecteur face au stress métallique.

La tolérance des plantes et des champignons aux ETM est un concept difficile à définir. Celle-ci pourrait se traduire par un bon développement de ces organismes à différents niveaux de contamination en métaux, mais il est difficile de déterminer si la plus forte biomasse des plantes mycorhizées (observée pour 4 isolats fongiques sur 5), comparée aux plantes non mycorhizées, est due à une diminution de l'effet toxique des métaux ou à une amélioration de la nutrition de la plante. Les performances de croissance de la plante sont améliorées de manière variable par la mycorhization, en fonction du substrat de culture considéré et de

l'inoculum fongique utilisé. Les souches de champignons MA isolées de sols riches en ETM semblent être les plus aptes à réduire la concentration en Cd dans la plante, donc à améliorer la tolérance des plantes. Le choix du champignon est en effet crucial, le *Glomus intraradices* (G.i. n°1) utilisé a eu un rôle combiné particulier sur la croissance de la plante et sur la sorption des éléments, qui peut différer de celui d'autres espèces ou isolats de champignons. Ainsi, par exemple *G. mosseae* P2, provenant également d'un sol pollué, aurait un effet moindre sur la croissance et une capacité de sorption plus importante, mais il n'a pas été possible de séparer et de quantifier clairement ces deux effets. Ces champignons isolés de sites pollués pourraient être qualifiés de champignons « tolérants » aux métaux car ils sont capables de coloniser la plante en présence d'ETM et d'avoir un effet significatif sur le transfert d'ETM et sur la croissance végétale. Mais cette notion de tolérance est à nuancer car la toxicité des métaux peut par exemple réduire la germination des spores de champignon sans empêcher la colonisation des racines et l'effet bénéfique du champignon sur la plante.

De plus, les expériences réalisées au cours de l'étude étaient des cultures en pot avec des terres contaminées préparées (tamisage, séchage, stérilisation) au laboratoire qui de ce fait s'éloignent des conditions *in situ*. La mycorhization des plantes par le champignon inoculé, déjà potentiellement affectée par les conditions physico-chimiques des terres utilisées, pouvait aussi être diminuée à cause de la forte densité racinaire due au volume de sol restreint dans les pots. Il a en effet été montré précédemment que l'effet de la mycorhization sur la croissance des plantes peut être réduit lorsque le volume du pot de culture est faible. Ainsi, l'effet de la colonisation mycorhizienne sur la croissance de la plante et sur le transfert de Cd peut être différente dans un sol en conditions *in situ*, une extrapolation des résultats observés doit donc être faite avec précaution.

D'autre part, la plante étudiée (*Medicago truncatula*) était une légumineuse. Cette famille de plantes est intéressante pour ses fortes interactions avec les microorganismes symbiotiques du sol (champignons et bactéries). Leur capacité à s'associer avec des bactéries du genre *Rhizobium* leur confère un intérêt en agronomie car elle contribue à enrichir le sol en azote. Nous avons pu voir que cette propriété peut être fortement stimulée par l'inoculation mycorhizienne et peut jouer un rôle déterminant sur le bilan de Cd. Il faut donc bien préciser que les effets du champignon MA observés dans ce travail peuvent différer avec d'autres familles de plantes moins aptes à établir des symbioses et ayant un autre schéma d'accumulation ou d'exclusion des ETM dans leurs tissus. *Medicago truncatula* constitue

néanmoins un modèle d'étude précieux sur lequel les recherches concernant l'expression des gènes lors de la symbiose mycorhizienne fourniront certainement des avancées majeures pour la compréhension des interactions complexes entre la plante et les champignons MA et qui autoriseront une meilleure maîtrise de l'usage d'inoculum mycorhizien en recherche appliquée.

#### **4. Perspectives**

Prédire le transfert de Cd dans le sol et son accumulation dans les plantes est un enjeu important et la prise en compte des mycorhizes dans les modèles de transfert des ETM pourrait permettre de les améliorer. Le mycélium extraracinaire peut être considéré comme une extension racinaire, augmentant la surface d'absorption dans le sol. Des études plus précises sur les mécanismes de prélèvement et d'immobilisation du cadmium par les champignons en fonction de la spéciation du métal dans le sol doivent néanmoins être poursuivies. Les résultats obtenus dans ce travail montrent aussi que dans des conditions édaphiques où les éléments sont peu limitants, l'impact de la colonisation mycorhizienne sur la croissance de la plante et sur le transfert de Cd est un paramètre déterminant à prendre en compte.

La baisse de la concentration en ETM dans la plante peut être le résultat de l'accroissement de la biomasse végétale par le champignon (« effet dilution ») et/ou d'une immobilisation des métaux plus importante dans la rhizosphère des plantes mycorhizées. Pour essayer de séparer l'effet nutritif (effet biomasse) de l'atténuation de la toxicité des métaux par le champignon, il faudrait réaliser de nouvelles expériences en pot en absence/présence d'ETM, à différents niveaux de fertilisation (limitant / non limitant), ou ajouter de l'engrais phosphaté ou d'autres nutriments dans les traitements non mycorhizés pour pallier à l'effet biomasse dû à la mycorhization et avoir des plantes mycorhizées et non mycorhizées de tailles égales. Il serait aussi intéressant de réaliser de nouveaux essais de sorption du Cd à court terme en solution, avec d'autres isolats de champignons et des plantes plus jeunes en essayant d'améliorer le développement du mycélium dans le dispositif à compartiment en milieu simplifié, et en mesurant aussi la capacité de sorption de plantes mycorhizées en présence d'un mélange de plusieurs ETM en solution (Zn et Cd par exemple).

D'autre part, pour éclaircir les mécanismes de protection au niveau cellulaire (production de protéines de tolérance au stress ou de molécules complexants les métaux pour les stocker dans les vacuoles), intrinsèques au champignon ou induits chez la plante par le champignon, des études poussées sur l'expression des gènes lors de la symbiose sont nécessaires et constituent déjà le sujet de recherche de plusieurs laboratoires, mais ne faisait pas l'objet de la thèse. De telles recherches en génétique et biologie moléculaire permettront de mieux comprendre comment fonctionne la symbiose mycorhizienne arbusculaire. Nos travaux montrent combien la mycorhization par des champignons MA est difficile à maîtriser et est variable d'une condition à l'autre et d'un isolat fongique à l'autre. Une meilleure compréhension des interactions moléculaires entre le champignon et son hôte permettrait ainsi de mieux maîtriser la colonisation du système racinaire par le champignon. Mais les résultats obtenus ici soulignent l'importance du choix du modèle plante hôte-champignon et des conditions expérimentales pour étudier ces interactions moléculaires.

Alors que des formes ioniques libres de Cd semblent être facilement transférées à la plante jusqu'aux parties aériennes, le champignon pourrait également transporter d'autres formes de Cd (complexes organiques ? inorganiques ?) qui seraient plutôt immobilisées dans le système racinaire (sorption sur les parois et membranes cellulaires ? stockage dans les vacuoles ?) et peu transférées dans les parties aériennes de la plante. Savoir si cette capacité de prélèvement et de séquestration du Cd par le mycélium est similaire à celle des racines n'a pas pu être éclairci dans ce travail et mériterait d'autres investigations. L'utilisation de dispositifs de cultures *in vitro* avec plante entière sur boîte de Pétri compartimentée (Voets et al., 2005) permettrait d'étudier plus précisément le prélèvement par les hyphes de différentes formes de Cd placées dans le milieu de culture. Ces cultures *in vitro* seraient aussi utiles pour étudier l'exsudation par le champignon de composés susceptibles de modifier la mobilité du Cd dans le sol. Les champignons MA sont en effet connus pour produire de grandes quantités d'une glycoprotéine (la glomaline) influençant l'agrégation des particules de sol et aussi capable de séquestrer les métaux. Les glycoprotéines produites par le champignon dans nos systèmes de culture et l'estimation de leur capacité à fixer les métaux aurait ainsi été un paramètre supplémentaire intéressant à mesurer. De plus, la production par le champignon de molécules (acides organiques ?) solubilisant les métaux ou acidifiant le milieu (sur le modèle d'altération par les racines ou par d'autres microorganismes) pourrait être analysée.

L'utilisation des champignons MA en bioremédiation a déjà et peut-être envisagée, mais dans des conditions à définir. D'une part, étant donné leur effet protecteur contre le stress métallique améliorant la croissance des plantes en milieu contaminé, l'inoculation de champignons MA a bien souvent été mentionnée pour favoriser la reconstruction d'un couvert végétal sur des sites très contaminés. D'autre part, les observations faites dans les travaux présentés indiquent aussi qu'un isolat tel que le *G. intraradices* (G.i. n°1) étudié peut améliorer la phytoextraction du Cd en multipliant par deux la quantité totale de Cd exportée dans les parties aériennes de la luzerne (soit 0,3 à 1,5% du Cd total du sol transféré à la plante en 45 jours de culture). Une application *in situ* n'est néanmoins pas encore complètement réalisable dans la majorité des sites pollués. En effet, cette inoculation est envisageable dans le cas où le potentiel mycorhizien indigène est faible voire inexistant. Dans le cas contraire, l'inoculation *in situ* d'un champignon sélectionné peut être inefficace à cause de la compétition avec les autres microorganismes indigènes du sol et d'autres conditions édaphiques qui empêchent le champignon inoculé de bien coloniser le milieu et d'avoir les mêmes effets que ceux observés en laboratoire. La compétitivité des isolats de champignons mycorhiziens et la co-inoculation d'isolats sont rarement prises en compte dans les travaux concernant le rôle des mycorhizes dans les sols pollués par les métaux. De nombreuses études *in situ* sont donc encore nécessaires en prenant en compte la compétition entre champignons indigènes et champignons inoculés pour pouvoir améliorer la phytoremédiation avec des champignons MA. Il s'agirait de développer une technique d'inoculation efficace avec un isolat fongique adapté et capable d'avoir un effet significatif sur le développement des plantes. Différents couples plante-champignon devraient ainsi être testés et sur différents types de sols, en conditions de sol non désinfecté. De plus, l'étude de consortium de champignons MA au lieu d'isolats individuels mériterait d'être envisagée. Pour cela, des expériences au laboratoire (cultures en pot, en dispositifs à compartiment ou en culture *in vitro*) avec des communautés sélectionnées de plusieurs isolats ou espèces de champignons MA doivent encore être menées pour mieux comprendre les interactions entre les différents champignons, mais aussi entre les champignons MA et les autres microorganismes du sol. Pour compléter cette étude et déterminer comment l'interaction champignon MA / *Rhizobium* améliore le développement de la plante dans un sol contaminé en ETM, des cultures en présence ou en absence de métaux, à différentes concentrations, avec les deux types de microorganismes seraient ainsi nécessaires.

Les champignons MA pourraient permettre de lever certaines limitations de la phytoextraction qui rendent cette technique encore peu efficace. D'après Van Nevel et al. (2007), les quantités théoriques de métaux extraites par les plantes utilisées en phytoextraction sont en général surestimées par rapport à la réalité pour trois raisons : d'abord, des cultures successives entraînent une diminution de la concentration en métal disponible, réduisant la quantité de métal extraite à chaque récolte, ensuite, la production de biomasse diminue au cours des cultures successives à cause d'un manque de nutriments et d'attaques de pathogènes, enfin, la présence de plusieurs ETM dans le sol à dépolluer affecte aussi le rendement des plantes. Nos résultats indiquent que l'inoculation de champignons MA dans des essais de phytoextraction pourrait réduire ces inconvénients. En effet, dans certaines conditions de sol, l'inoculation avec *G. intraradices* a augmenté la concentration en Cd extractible en fin de culture par rapport à la culture non mycorhizée, et donc pourrait peut-être améliorer la disponibilité des métaux après plusieurs cultures. De plus, les champignons MA peuvent améliorer de manière significative la biomasse de la plante en supplémentant sa nutrition en cas de carences et en la protégeant des pathogènes et du stress métallique. La rotation des cultures au cours d'une campagne de phytoextraction, en particulier avec l'utilisation de légumineuses à certains moments, permettrait aussi d'améliorer la fertilité du sol, avec le champignon MA comme stimulant des bactéries fixatrices d'azote. Enfin, en élargissant le rayon d'action des racines, le développement du mycélium fongique pourrait aussi permettre de dépolluer un volume de sol plus conséquent.

Toutefois, la maîtrise du système plante – champignon dans les sols est complexe et difficile. Une alternative serait de considérer chaque situation de sol contaminé en déterminant le potentiel mycorhizien du sol, c'est-à-dire mesurer la diversité de la population mycorhizienne indigène et évaluer sa tolérance aux métaux et son efficacité quant au développement des plantes. En cas de bon potentiel mycorhizien, le développement des champignons indigènes pourrait être favorisé, par exemple par une réduction de la concentration en phosphore dans le sol (diminution des apports). En cas de faible potentiel mycorhizien, l'inoculation de souches de champignons compétitives et efficaces pourrait alors être envisagée.

# **Bibliographie**



## Références bibliographiques

*Note : Seules les références citées dans les parties en français sont données dans la liste ci-dessous.*

**Abdel-Sabour MF, Mortvedt JJ, Kelsoe JJ, 1988.** Cadmium-Zinc interactions in plants and extractable cadmium and zinc fractions in soil. *Soil Science* 145: 424-431.

**Ahnstrom ZS, Parker DR, 1999.** Development and assessment of a sequential extraction procedure for the fractionation of soil cadmium. *Soil Science Society of America Journal* 63: 1650-1658.

**Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H, 2005.** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824-827.

**Anderson PR, Christensen TH, 1988.** Distribution coefficients of Cd, Co, Ni and Zn in soils. *Journal of Soil Science* 39 : 15-22.

**Andrade SAL, Abreu CA, de Abreu MF, Silveira APD, 2004.** Influence of lead additions on arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* symbioses under soybean plants. *Applied Soil Ecology* 26: 123-131.

**Artursson V, Finlay RD, Jansson JK, 2006.** Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* 8: 1-10.

**Audet P, Charest C, 2006.** Effects of AM colonization on “wild tobacco” plants grown in zinc-contaminated soil. *Mycorrhiza* 16: 277-283.

**Audet P, Charest C, 2007a.** Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. *Environmental Pollution* 147: 231-237.

**Audet P, Charest C, 2007b.** Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: meta-analytical and conceptual perspectives. *Environmental Pollution* 147: 609-614.

- Augé RM, 2001.** Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3-42.
- Axelson KB, Palmgren MG, 2001.** Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126: 696-706.
- Baize D, 1997.** Teneurs totales en éléments métalliques dans les sols (France) – Références et stratégies d'interprétation. INRA éditions, Paris, 410 p.
- Baker AJM, Walker PL, 1989.** Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. *Chemical Speciation and Bioavailability* 1: 7-17.
- BodSchV, 1999.** Federal Soil Protection and Contaminated Sites Ordinance, 64.
- Benedetto A, Magurno F, Bonfante P, Lanfranco L, 2005.** Expression profiles of a phosphate transporter gene (GmosPT) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 15: 620-627.
- Boawn LC, Rasmussen PE, 1971.** Crop response to excessive zinc fertilization of alkaline soil. *Agronomy Journal* 63: 874-876.
- Boddington CL, Bassett EE, Jakobsen I, Dodd JC, 1999.** Comparison of techniques for the extraction and quantification of extra-radical mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 479-482.
- Bonfante P, Perotto S, 1995.** Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist* 130: 3-21.
- Bonin I, Huguet T, Gherardi M, Prosperi JM, Olivieri I, 1996.** High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species *Medicago truncatula* Gaertn. using RAPDs markers. *American Journal of Botany* 83: 43-855.

- Bourrelier P-H, Berthelin J, 1998.** Contamination des sols par les éléments en traces: les risques et leur gestion. Rapport de l'Académie des sciences n°42, 440 p.
- Bovet L, Feller U, Martinoia E, 2005.** Possible involvement of plant ABC transporters in cadmium detoxification: a cDNA sub-microarray approach. *Environmental International* 31: 263-267.
- Bradl HB, 2004.** Adsorption of heavy metal ions on soils and soils constituents. *Journal of Colloid and Interface Science* 277: 1-18.
- Briones R, 2002.** Caractérisation des propriétés de surface des champignons mycorhiziens à arbuscules (MA) et relation avec l'adsorption du cadmium et du cuivre. Thèse de l'Université Nancy I.
- Buee M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, Bécard G, 2000.** The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 693-698.
- Cairney JWG, Meharg AA, 1999.** Influences of anthropogenic pollution on mycorrhizal fungal communities. *Environmental Pollution* 106: 169-182.
- Chaney R, Malik M, Li YM, Brown SL, Brewer EP, Angle JS, Baker AJM, 1997.** Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology* 8: 279-284.
- Chen BD, Christie P, Li X, 2001.** A modified glass bead compartment cultivation system for studies on nutrient and trace metal uptake by arbuscular mycorrhiza. *Chemosphere* 42: 185-192.
- Chen B, Jakobsen I, Roos P, Zhu YG, 2005.** Effects of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on uranium uptake and accumulation by *Medicago truncatula* L. from uranium-contaminated soil. *Plant and Soil* 275: 349-359.

- Chen BD, Zhu YG, Duan J, Xiao XY, Smith SE, 2007.** Effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and metal uptake by four plant species in copper mine tailings. *Environmental Pollution* 147: 374-380.
- Chrestensen CA, Starke DW, Mieyal JJ, 2000.** Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 26556-26565.
- Cieslinski G, Van Rees KCJ, Szmigielska AM, Krishnamurti GSR, Huang PM, 1998.** Low-molecular-weight organic acids in rhizosphere soils of durum wheat and their effect on cadmium bioaccumulation. *Plant and Soil* 203: 109-117.
- Clark, 1997.** Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mineral acquisition at low pH. *Plant and Soil* 192: 15-22.
- Clemens S, Palmgren MG, Krämer U, 2002.** A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 7: 309-315.
- Clemens S, 2006.** Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88: 1707-1719.
- Cobbett CS, 2000.** Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology* 123: 825-832.
- Cohen CK, Fox TC, Garvin DF, Kochian LV, 1998.** The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiology* 116: 1063-1072.
- Cunningham SD, Berti WR, Huang JW, 1995.** Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology* 13: 393-397.
- Cook DR, 1999.** *Medicago truncatula* – a model in the making! *Current Opinion in Plant Biology* 2: 301-304.

- Cooper KM, Tinker PB, 1978.** Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. II - Uptake and translocation of phosphorus, zinc and sulphur. *New Phytologist* 81: 43-52.
- Cornu JY, Denaix L, 2006.** Prediction of zinc and cadmium phytoavailability within a contaminated agricultural site using DGT. *Environmental Chemistry* 3, 61-64.
- Cui M, Caldwell MM, 1996.** Facilitation of plant phosphate acquisition by arbuscular mycorrhizas from enriched soil patches. II – Hyphae exploiting root-free soil. *New Phytologist* 133: 461-467.
- Cutler JM, Rains DW, 1974.** Characterization of cadmium uptake by plant tissue. *Plant Physiology* 54: 67-71.
- Das P, Samantaray S, Rout GR, 1997.** Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution* 98: 29-36.
- Desjardin V, Bayard R, Huck N, Manceau A, Gourdon R, 2002.** Effect of microbial activity on the mobility of chromium in soils. *Waste Management* 22: 195-200.
- Díaz G, Azcón-Aguilar C, Honrubia M, 1996.** Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Plant and Soil* 180: 241-249.
- Dixit V, Pandey V, Shyam R, 2001.** Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany* 52: 1101-1109.
- Domsch KH, 1984.** Effects of pesticides and heavy metals on biological processes in soil. *Plant and Soil* 76: 367-378.

- Drew EA, Murray RS, Smith SE, Jakobsen I, 2003.** Beyond the rhizosphere: growth and function of arbuscular mycorrhizal external hyphae in sands of varying pore sizes. *Plant and Soil* 251: 105-114.
- Drew EA, Murray RS, Smith SE, 2006.** Functional diversity of external hyphae of AM fungi: Ability to colonise new hosts is influenced by fungal species, distance and soil conditions. *Applied Soil Ecology* 32: 350-365.
- Dupré de Boulois H, Joner EJ, Leyval C, Jakobsen I, Chen BD, Roos P, Thiry Y, Rufyikiri G, Delvaux, Declerck S, 2008.** Role and influence of mycorrhizal fungi on radiocesium accumulation by plants. *Journal of Environmental Radioactivity* 99: 785-800.
- Echeverria JC, Morera MT, Mazkaran C, Garrido JJ, 1998.** Competitive sorption of heavy metal by soils. Isotherms and fractional factorial experiments. *Environmental Pollution* 101: 275-284.
- El-Kherbawy M, Angle JS, Heggo A, Chaney RL, 1989.** Soil pH, rhizobia, and vesicular-arbuscular mycorrhizae inoculation effects on growth and heavy metal uptake of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Biology and Fertility of Soils* 8: 61-65.
- Elsen A, Baimey H, Swennen R, De Waele D, 2003.** Relative mycorrhizal dependency and mycorrhiza-nematode interaction in banana cultivars (*Musa* spp.) differing in nematode susceptibility. *Plant and Soil* 256: 303-313.
- Emmerson BT, 1970.** “Ouch-Ouch” disease: the Osteomalacia of cadmium nephropathy. *Annals of Internal Medicine* 73: 854-855.
- Entry JA, Rygiewicz PT, Watrud LS, Donnelly PK, 2002.** Influence of adverse soil conditions on the formation and function of Arbuscular mycorrhizas. *Advances in Environmental Research* 7: 123-138.

- Filion M, St-Arnaud M, Fortin JA, 1999.** Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. *New Phytologist* 141: 525-533.
- Finlay RD, 2008.** Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany* 59: 1115-1126.
- Fomina MA, Alexander IJ, Colpeart JV, Gadd GM, 2005.** Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 851-866.
- Gadd GM, 1993a.** Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist* 124: 25-60.
- Gadd GM, 1993b.** Microbial formation and transformation of organometallic and organometalloid compounds. *FEMS Microbiology Reviews* 11: 297-316.
- Gadd GM, 2004.** Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122: 109-119.
- Gadd GM, Burford EP, Fomina M, 2003.** Biogeochemical activities of microorganisms in mineral transformations: consequences for metal and nutrient mobility. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 13: 323-331.
- Gadkar V, Rillig MC, 2006.** The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. *FEMS Microbiology Letters* 263: 93-101.
- Galli U, Schuëpp H, Brunold C, 1994.** Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum* 92: 364-368.
- Gaur A, Adholeya A, 2004.** Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science* 86: 528-534.

- Gérard E, Echevarria G, Sterckeman T, Morel JL, 2000.** Cadmium availability to three plant species varying in cadmium accumulation pattern. *Journal of Environmental Quality* 29: 1117-1123.
- Gianinazzi-Pearson V, 1996.** Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *The Plant Cell* 8: 1871-1883.
- Giasson P, Jaouich A, Gagné S, Moutoglis P, 2005.** Arbuscular mycorrhizal fungi involvement in zinc and cadmium speciation change and phytoaccumulation. *Remediation* 15: 75-81.
- Giasson P, Jaouich A, Cayer P, Gagné S, Moutoglis P, Massicotte L, 2006.** Enhanced phytoremediation: a study of mycorrhizoremediation of heavy metal-contaminated soil. *Remediation* 17: 97-110.
- Gildon A, Tinker PB, 1983.** Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. I. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist* 95: 247-261.
- Giovannetti M, Mosse B, 1980.** An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489-500.
- Göhre V, Paszkowski U, 2006.** Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223: 1115-1122.
- Gonzalez-Chavez C, D'Haen J, Vangronsveld J, Dodd JC, 2002.** Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant and Soil* 240: 287-297.
- González-Chávez MC, Carillo-González R, Wright SF, Nichols KA, 2004.** The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution* 130: 317-323.

- González-Guerrero M, Melville LH, Ferrol N, Lott JNA, Azcón-Aguilar C, Peterson RL, 2008.** Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Canadian Journal of Microbiology* 54: 103-110.
- Gray CW, McLaren RG, Günther D, Sinaj S, 2004.** An assessment of cadmium availability in cadmium-contaminated soils using isotope exchange kinetics. *Soil Science Society of America Journal* 68: 1210-1217.
- Grěman H, Velikonja-Bolta Š, Vodnik D, Kos B, Leštan D, 2001.** EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity. *Plant and Soil* 235: 105-114.
- Guerinot ML, 2000.** The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 190-198.
- Hall JL, 2002.** Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53: 1-11.
- Hall JL, Williams LE, 2003.** Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* 54: 2601-2613.
- Haney CJ, Grass G, Franke S, Rensing C, 2005.** New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32: 215-226.
- Hao L, Zhang J, Christie P, Li X, 2008.** Response of two maize inbred lines with contrasting phosphorus efficiency and root morphology to mycorrhizal colonization at different soil phosphorus supply levels. *Journal of Plant Nutrition* 31: 1059-1073.
- Harley JL, Harley EL, 1987.** A check-list of mycorrhiza in the British flora. *The New Phytologist* (supplement) 105: 1-102.

**Harley JL, Smith SE, 1983.** Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London, 483 pp.

**Harrison MJ, Dewbre GR, Liu J, 2002.** A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Cell* 14: 2413-2429.

**Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, Sullivan LA, Kochian LV, 1998.** Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiology* 116: 1413-1420.

**Hause B, Mrosk C, Isayenkov S, Strack D, 2007.** Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry* 68: 101-110.

**Hazen TC, Tabak HH, 2005.** Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides: 2. Field research on bioremediation of metals and radionuclides. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 4: 157-183.

**Heggo A, Angle JS, Chaney RL, 1990.** Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. *Soil Biology and Biochemistry* 22: 865-869.

**van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR, 1998.** Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 72-75.

**van der Heijden MGA, Streitwolf-Engel R, Riedl R, Siegrist S, Neudecker A, Ineichen K, Boller T, Wiemken A, Sanders IR, 2006.** The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist* 172: 739-752.

**Hildebrandt U, Kaldorf M, Bothe H, 1999.** The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology* 154: 709-717.

- Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H, 2007.** Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68: 139-146.
- Hutchinson JJ, Young SD, Black CR, West HM, 2004.** Determining uptake of radio-labile soil cadmium by arbuscular mycorrhizal hyphae using isotopic dilution in a compartmented-pot system. *New Phytologist* 164: 477-484.
- INERIS, 2005.** Cadmium et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, 60 p.
- Jakobsen I, Abbott LK, Robson AD, 1992a.** External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 1. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytologist* 120: 371-380.
- Jakobsen I, Abbott LK, Robson AD, 1992b.** External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 2. Hyphal transport of  $^{32}\text{P}$  over defined distances. *New Phytologist* 120: 509-516.
- Jalali M, Khanlari ZV, 2008.** Effect of aging process on the fractionation of heavy metals in some calcareous soils of Iran. *Geoderma* 143: 26-40.
- Janoušková M, Vosátka M, 2005.** Response to cadmium of *Daucus carota* hairy roots dual cultures with *Glomus intraradices* or *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza* 15: 217-224.
- Janoušková M, Pavliková D, Vosátka M, 2006.** Potential contribution of arbuscular mycorrhiza to cadmium immobilisation in soil. *Chemosphere* 65: 1959-1965.
- Jarvis SC, Jones LHP, Hopper MJ, 1976.** Cadmium uptake from solution by plants and its transport from roots to shoots. *Plant and Soil* 44: 179-191.
- Javot H, Pumplin N, Harrison MJ, 2007.** Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant, Cell and Environment* 30: 310-322.

- Jin H, Pfeffer PE, Douds DD, Piotrowski E, Lammers PJ, Shachar-Hill Y, 2005.** The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 168: 687-696.
- Joner EJ, Leyval C, 1997.** Uptake of  $^{109}\text{Cd}$  by roots and hyphae of a *Glomus mosseae*/*Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentrations of cadmium. *New Phytologist* 135: 353-360.
- Joner EJ, Leyval C, 2001.** Time-course of heavy metal uptake in maize and clover as affected by root density and different mycorrhizal inoculation regimes. *Biology and Fertility of Soils* 33: 351-357.
- Joner EJ, Briones R, Leyval C, 2000.** Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant and Soil* 226: 227-234.
- Kabata-Pendias A, Pendias H, 1992.** Trace elements in soils and plants, 2<sup>nd</sup> edition, CRC Press, 365 p.
- Kabata-Pendias A, 2004.** Soil-plant transfer of trace elements – an environmental issue. *Geoderma* 122: 143-149.
- Kaldorf M, Kuhn AJ, Schröder WH, Hildebrandt U, Bothe H, 1999.** Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology* 154: 718-728.
- Kandeler E, Tschirko D, Bruce KD, Stemmer M, Hobbs PJ, Bardgett RD, Amelung W, 2000.** Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. *Biology and Fertility of Soils* 32: 390-400.
- Kapoor R, Bhatnagar AK, 2007.** Attenuation of cadmium toxicity in mycorrhizal celery (*Apium graveolens* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1083-1089.

- Karagiannidis N, Hadjisavva-Zinoviadi, 1998.** The mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* enhances growth, yield and chemical composition of a durum wheat variety in 10 different soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 52: 1-7.
- Khan AG, Kuek C, Chaudhry TM, Khoo CS, Hayes WJ, 2000.** Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41: 197-207.
- Khan AG, 2005.** Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of trace Elements in Medicine and Biology* 18: 355-364.
- Khan AG, 2006.** Mycorrhizoremediation – an enhanced form of phytoremediation. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 7: 503-514.
- Killham K, Firestone MK, 1983.** Vesicular arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acidic and heavy metal depositions. *Plant and Soil* 72: 39-48.
- Kirkham MB, 2006.** Cadmium in plants on polluted soils: effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma* 137: 19-32.
- Klironomos JN, McCune J, Hart M, Neville J, 2000.** The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecology Letters* 3: 137-141.
- Koide RT, Kabir Z, 2000.** Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytologist* 148: 511-517.
- Koske RE, Gemma JN, 1989.** A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological research* 92: 486-505.

- Kosuta S, Chabaud M, Lougnon G, Gough C, Denarie J, Barker DG, Bécard G, 2003.** A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 131: 952-962.
- Krämer U, Chardonnens AN, 2001.** The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 661-672.
- Krishnamurti GSR, Naidu R, 2003.** Solid-solution equilibria of cadmium in soils. *Geoderma* 113: 17-30.
- Krishnamurti GSR, McArthur DFE, Wang MK, Kozak LM, Huang PM, 2005.** Biogeochemistry of soil cadmium and the impact on terrestrial food chain contamination. In: Huang PM and Gobran GR (Eds) *Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere*. Elsevier, Amsterdam, pp. 197-257.
- Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P, Amarger N, 2001.** Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147: 981-993.
- Lakzian A, Murphy P, Turner A, Beynon JL, Giller KE, 2002.** *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations in soils with increasing heavy metal contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 519-529.
- Lanfranco L, Bolchi A, Ros EC, Ottonello S, Bonfante P, 2002.** Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Physiology* 130: 58-67.
- Larsen PB, Degenhardt J, Stenzler LM, Howell SH, Kochian LV, 1998.** Aluminium-resistant *Arabidopsis* mutant that exhibit altered patterns of aluminium accumulation and organic acid release from roots. *Plant Physiology* 117: 9-18.

- Lasat MM, 2002.** Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31: 109-120.
- LeDuc DL, Terry N, 2005.** Phytoremediation of toxic trace elements in soil and water. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32: 514-520.
- Lee YJ, George E, 2005.** Contribution of mycorrhizal hyphae to the uptake of metal cations by cucumber plants at two levels of phosphorus supply. *Plant and Soil* 278: 361-370.
- Leštan D, Luo CL, Li XD, 2008.** The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: A review. *Environmental Pollution* 153: 3-13.
- Leyval C, Singh BR, Joner EJ, 1995.** Occurrence and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in some Norwegian soils influenced by heavy metals and soil properties. *Water, Air and Soil Pollution* 84: 203-216.
- Leyval C, Turnau K, Haselwandter K, 1997.** Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7: 139-153.
- Leyval C, Joner EJ, 2001.** Bioavailability of heavy metals in the mycorrhizosphere. In: GR Gobran, W Wenzel, E Lombi (Eds) *Trace Elements in the Rhizosphere*. CRC Press, Boca Raton, pp. 165-185.
- Leyval C, 2005.** Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on heavy metal and radionuclide transfer to plants. In: PM Huang & GR Gobran (Eds) *Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere*. Elsevier, Amsterdam, pp. 419-429.
- Lima AIG, Pereira SIA, Figueira EMAP, Caldeira GCN, de Matos Caldeira HDQ, 2006.** Cadmium detoxification in roots of *Pisum sativum* seedlings: relationship between toxicity levels, thiol pool alterations and growth. *Environmental and Experimental Botany* 55: 149-162.

- Lingua G, Franchin C, Todeschini V, Castiglione S, Biondi S, Burlando B, Parravicini V, Torrigiani P, Berta G, 2008.** Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environmental Pollution* 153: 137-147.
- Logi C, Sbrana C, Giovannetti M, 1998.** Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3473-3479.
- Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP, Young SD, Sacchi GA, 2001.** Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytologist* 149: 53-60.
- López-Millán AF, Ellis DR, Grusak MA, 2004.** Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology* 54: 583-596.
- Lozano-Rodríguez E, Hernández LE, Bonay P, Carpena-Ruiz RO, 1997.** Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. *Journal of Experimental Botany* 48: 123-128.
- Lu A, Zhang S, Shan XQ, 2005.** Time effect on the fractionation of heavy metals in soils. *Geoderma* 125: 225-234.
- Maldonado-Mendoza I, Dewbre GR, Harrison MJ, 2001.** A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1140-1148.
- McBride MB, 1989.** Reactions controlling heavy metal solubility in soils. *Advances in Soil Science* 10: 1-56.

- McBride MB, 1994.** Chemisorption and precipitation of inorganic ions. In: McBride MB (Ed) Environmental chemistry of soils. Oxford University Press, New York, pp. 121-168.
- McGrath SP, Chaudri AM, Giller KE, 1995.** Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. *Journal of Industrial Microbiology* 14: 94-104.
- McGrath SP, Zhao FJ, Lombi E, 2001.** Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant and Soil* 232: 207-214.
- Meagher RB, 2000.** Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 153-162.
- Meharg, 2003.** The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal ions. *Mycological Research* 107: 1253-1265.
- Mendez MO, Maier RM, 2008.** Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments - an emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives* 116: 278-283.
- Menzies NW, Donn MJ, Kopittke PM, 2007.** Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environmental Pollution* 145: 121-130.
- Miller RM, Jastrow JD, 1990.** Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interactions with soil aggregation. *Soil Biology and Biochemistry* 22: 579-584.
- Miller RM, Reinhardt DR, Jastrow JD, 1995.** External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia* 103: 17-23.
- Monzon A, Azcón R, 1996.** Relevance of mycorrhizal fungal origin and host plant genotype to inducing growth and nutrient uptake in *Medicago* species. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 60: 9-15.

- Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF, 2001.** Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology* 60: 193-207.
- Mullins GL, Sommers LE, 1986.** Cadmium and zinc influx characteristics by intact corn (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant and Soil* 96: 153-164.
- Nagahashi G, Douds DD, 1997.** Appressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots. *New Phytologist* 136: 299-304.
- Nan Z, Li J, Zhang J, Cheng G, 2002.** Cadmium and zinc interactions and their transfer in soil-crop system under actual field conditions. *The Science of the Total Environment* 285: 187-195.
- Neugschwandtner RW, Tlustoš P, Komárek M, Száková J, 2008.** Phytoextraction of Pb and Cd from a contaminated agricultural soil using different EDTA application regimes: Laboratory versus field scale measures of efficiency. *Geoderma* 144: 446-454.
- Neumann H, Bode-Kirchhoff A, Madeheim A, Wetzel A, 1998.** Toxicity testing of heavy metals with the *Rhizobium*-Legume symbiosis: high sensitivity to cadmium and arsenic compounds. *Environmental Science and Pollution Research* 5: 28-36.
- Newman EI, 1966.** A method of estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology* 3: 139-145.
- Nies DH, 2003.** Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 313-339.
- Nolan AL, Zhang H, McLaughlin MJ, 2005.** Prediction of zinc, cadmium, lead and copper availability to wheat in contaminated soils using chemical speciation, diffusive gradients in thin films, extraction, and isotopic dilution techniques. *Journal of Environmental Quality* 34: 496-507.

- Norini MP, 2007.** Écodynamique des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans des sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique : influence de la rhizosphère et de la mycorrhization. Thèse de l'Université Nancy I.
- Nriagu JO, Pacyna JM, 1988.** Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333: 134-139.
- Offre P, Pivato B, Siblot S, Gamalero E, Corberand T, Lemanceau P, Mougel C, 2007.** Identification of bacterial groups preferentially associated with mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 913-921.
- Ohya T, Iikura H, Tanoi K, Nishiyama H, Nakanishi TM, 2005.** <sup>109</sup>Cd uptake and translocation in a soybean plant under different pH conditions. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 264: 303-306.
- Orlowska E, Ryszka P, Jurkiewicz A, Turnau K, 2005.** Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) strains in colonisation of plants involved in phytostabilisation of zinc wastes. *Geoderma* 129: 92-98.
- Ouziad F, Hildebrandt U, Schmelzer E, Bothe H, 2005.** Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology* 162: 634-649.
- Parniske M, 2004.** Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 414-421.
- Peijnenburg WJGM, Posthuma L, Eijsackers HJP, Allen HE, 1997.** A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37: 163-172.
- Peijnenburg WJGM, Jager T, 2003.** Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56: 63-77.

- Penmetsa RV, Cook DR, 2000.** Production and characterization of diverse developmental mutants of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 123: 1387-1397.
- Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C, 2002.** Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant Journal* 32: 539-548.
- Perriguet J, Sterckeman T, Morel JL, 2008.** Effect of rhizosphere and plant-related factors on the cadmium uptake by maize (*Zea mays* L.). *Environmental and Experimental Botany* 63: 333-341.
- Peters SM, Habte M, 2001.** Optimizing solution P concentration in a peat-based medium for producing mycorrhizal seedlings in containers. *Arid Land Research and Management* 15: 359-370.
- Piñeros MA, Shaff JE, Kochian LV, 1998.** Development, characterization, and application of a cadmium-selective microelectrode for the measurement of cadmium fluxes in roots of *Thlaspi* species and wheat. *Plant Physiology* 116: 1393-1401.
- Plaza S, Szigeti Z, Geisler M, Martinoia E, Aeschlimann B, Günther D, Pretsch, 2005.** Potentiometric sensor for the measurement of Cd<sup>2+</sup> transport in yeast and plants. *Analytical Biochemistry* 347: 10-16.
- Plenchette C, Fortin JA, Furlan V, 1983.** Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. I – Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant and Soil* 70: 199-209.
- Poulsen KH, Nagy R, Gao LL, Smith SE, Bucher M, Smith FA, Jakobsen I, 2005.** Physiological and molecular evidence for Pi uptake via the symbiotic pathway in a reduced mycorrhizal colonization mutant in tomato associated with a compatible fungus. *New Phytologist* 168: 445-453.

- Prokop Z, Cupr P, Zlevorova-Zlamalikova V, Komarek J, Dusek L, Holoubek I, 2003.** Mobility, bioavailability, and toxic effects of cadmium in soil samples. *Environmental Research* 91: 119-126.
- Quantin C, Becquer T, Rouiller JH, Berthelin J, 2001.** Oxide weathering and trace metal release by bacterial reduction in a New Caledonia Ferralsol. *Biogeochemistry* 53: 323-340.
- Ramírez DA, Valladares F, Blasco A, Bellot J, 2006.** Assessing transpiration in the tussock grass *Stipa tenacissima* L.: the crucial role of the interplay between morphology and physiology. *Acta Oecologica* 30: 386-398.
- Rauser WE, Meuwly P, 1995.** Retention of cadmium in roots of maize seedlings. *Plant Physiology* 109: 195-202.
- Read DJ, Perez-Moreno J, 2003.** Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? *New Phytologist* 157: 475-492.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE, 2000.** Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920-1921.
- Redon PO, Béguiristain T, Leyval C, 2008.** Influence of *Glomus intraradices* on Cd partitioning in a pot experiment with *Medicago truncatula* in four contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2710-2712.
- Redon P-O, Béguiristain T, Leyval C, 2009.** Various effects of AM fungal isolates on cadmium and zinc transfer to *Medicago truncatula* grown in a multimetallic contaminated agricultural soil. *Mycorrhiza* 19:187–195.
- Repetto O, Bestel-Corre G, Dumas-Gaudot E, Berta G, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, 2003.** Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots. *New Phytologist* 157: 555-567.

- Requena N, 2005.** Measuring quality of service: phosphate “à la carte” by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 168: 268-271.
- Requena N, Serrano E, Ocón A, Breuninger M, 2007.** Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* 68: 33-40.
- Rillig MC, Steinberg PD, 2002.** Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? *Soil Biology and Biochemistry* 34: 1371-1374.
- Rillig MC, Wright SF, Eviner VT, 2002.** The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effect of five plant species. *Plant and Soil* 238: 325-333.
- Rivera-Becerril F, Calantzis C, Turnau K, Caussanel JP, Belimov AA, Gianinazzi S, Strasser RJ, Gianinazzi-Pearson V, 2002.** Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *Journal of Experimental Botany* 53: 1177-1185.
- Rivera-Becerril F, van Tuinen D, Martin-Laurent F, Metwally A, Dietz KJ, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, 2005.** Molecular changes in *Pisum sativum* L. roots during arbuscular mycorrhiza buffering of cadmium stress. *Mycorrhiza* 16: 51-60.
- Robinson B, Fernández JE, Madejón P, Marañón T, Murillo JM, Green S, Clothier B, 2003.** Phytoextraction: an assessment of biogeochemical and economic viability. *Plant and Soil* 249: 117-125.
- Ross SM, 1994.** Toxic metals in soil-plant systems. Wiley publishers, Chichester, 469 p.
- Rufyikiri G, Huysmans L, Wannijn J, Van Hees M, Leyval C, Jakobsen I, 2004.** Arbuscular mycorrhizal fungi can decrease the uptake of uranium by subterranean clover grown at high levels of uranium in soil. *Environmental Pollution* 130: 427-436.

- Ruiz-Lozano JM, Azcon R, Gomez M, 1995.** Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 456-460.
- Ruiz-Lozano JM, 2003.** Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* 13: 309-317.
- Rydlová J, Vosátka M, 2003.** Effect of *Glomus intraradices* isolated from Pb-contaminated soil on Pb uptake by *Agrostis capillaris* is changed by its cultivation in a metal-free substrate. *Folia Geobotanica* 38: 155-165.
- Salam AK, Helmke PA, 1998.** The pH dependence of free ionic activities and total dissolved concentrations of copper and cadmium in soil solution. *Geoderma* 83: 281-291.
- Salt DE, Wagner GJ, 1993.** Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 12297-12302.
- Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, Raskin I, 1995.** Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. *Plant Physiology* 109: 1427-1433.
- Salt DE, Pickering IJ, Prince RC, Gleba D, Dushenkov S, Smith RD, Raskin I, 1997.** Metal accumulation by aquacultured seedlings of Indian mustard. *Environmental Science and Technology* 31: 1636-1644.
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gómez M, Romero-Puertas MC, del Río LA, 2001.** Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 2115-2126.
- Satoh M, Koyama H, Kaji T, Kito H, Tohyama C, 2002.** Perspectives on cadmium toxicity research. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 196: 23-32.
- Sayer JA, Cotter-Howells JD, Watson C, Hillier S, Gadd GM, 1999.** Lead mineral transformation by fungi. *Current Biology* 9: 691-694.

- Scervino JM, Ponce MA, Erra-Bassells R, Vierheilig H, Ocampo JA, Godeas A, 2005.** Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycological Research* 109: 789-794.
- Schaider LA, Parker DR, Sedlak DL, 2006.** Uptake of EDTA-complexed Pb, Cd and Fe by solution- and sand-cultured *Brassica juncea*. *Plant and Soil* 286: 377-391.
- Schreiner RP, Bethlenfalvay GJ, 1995.** Mycorrhizal interactions in sustainable agriculture. *Critical Reviews in Biotechnology* 15: 271-285.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C, 2001.** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413-1421.
- Schützendübel A, Polle A, 2002.** Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53: 1351-1365.
- Schwarzott D, Walker C, Schüßler A, 2001.** *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21: 190-197.
- Selosse MA, Le Tacon F, 1998.** The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology and Evolution* 13: 15-20.
- Serrano S, Garrido F, Campbell CG, Garcia-Gonzalez MT, 2005.** Competitive sorption of cadmium and lead in acid soils of Central Spain. *Geoderma* 124: 91-104.
- Smith SE, Read DJ, 1997.** *Mycorrhizal Symbiosis*, 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press, Sand Diego, 605 p.
- Smolders E, Brans K, Földi A, Merckx R, 1999.** Cadmium fixation in soils measured by isotopic dilution. *Soil Science Society of America Journal* 63: 78-85.

- Sneller FEC; Noordover ECM, Bookum WMT, Schat H, Bedaux JJM, Verkleij JAC, 1999.** Quantitative relationship between phytochelatin accumulation and growth inhibition during prolonged exposure to cadmium in *Silene vulgaris*. *Ecotoxicology* 8: 167-175.
- Stanhope KG, Young SD, Hutchinson JJ, Kamath R, 2000.** Use of isotopic dilution techniques to assess the mobilization of nonlabile Cd by chelating agents in phytoremediation. *Environmental Science and Technology* 34: 4123-4127.
- Sterckeman T, Douay F, Proix N, Fourrier H, 2000.** Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution* 107: 377-389.
- Sterckeman T, Perrigüey J, Caël M, Schwartz C, Morel JL, 2004.** Applying a mechanistic model to cadmium uptake by *Zea mays* and *Thlaspi caerulescens*: consequences for the assessment of the soil quantity and capacity factors. *Plant and Soil* 262: 289-302.
- Sterckeman T, Duquène L, Perrigüey J, Morel JL, 2005.** Quantifying the effect of rhizosphere processes on the availability of soil cadmium and zinc. *Plant and Soil* 276: 335-345.
- Stohs SJ, Bagchi D, 1995.** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine* 18: 321-336.
- Symeonides C, McRae SG, 1977.** The assessment of plant-available cadmium in soils. *Journal of Environmental Quality* 6: 120-123.
- Tao S, Liu WX, Chen YJ, Cao J, Li BG, Xu FL, 2005.** Fractionation and bioavailability of copper, cadmium and lead in rhizosphere soil. In: PM Huang & GR Gobran (Eds) *Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere*. Elsevier, Amsterdam, pp. 313-336.
- Tawaraya K, Naito M, Wagatsuma T, 2006.** Solubilization of insoluble inorganic phosphate by hyphal exudates of arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Nutrition* 29: 657-665.

- Tilman D, Wedin D, Knops J, 1996.** Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. *Nature* 379: 718-720.
- Tisdall JM, 1991.** Fungal hyphae and structural stability of soil. *Australian Journal of Soil Research* 29: 729-743.
- Tisdall JM, 1994.** Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant and Soil* 159: 115-121.
- Thayer JS, 2002.** Biological methylation of less-studied elements. *Applied Organometallic Chemistry* 16: 677-691.
- Thomine S, Lelièvre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H, 2003.** AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *The Plant Journal* 34: 685-695.
- Thygesen K, Larsen J, Bodker L, 2004.** Arbuscular mycorrhizal fungi reduce development of pea root-rot caused by *Aphanomyces euteiches* using oospores as pathogen inoculum. *European Journal of Plant Pathology* 110: 411-419.
- Todeschini V, Franchin C, Castiglione S, Burlando B, Biondi S, Torrigiani P, Berta G, Lingua G, 2007.** Responses to copper of two registered poplar clones inoculated or not with arbuscular mycorrhizal fungi. *Caryologia* 60: 146-155.
- Tonin C, Vandenkoornuyse P, Joner EJ, Straczek J, Leyval C, 2001.** Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola calaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. *Mycorrhiza* 10: 161-168.
- Trouvelot A, Kough J, Gianinazzi-Pearson V, 1986.** Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V and Gianinazzi S (eds) *Mycorrhizae: physiology and genetics*. INRA Press, Paris, pp 217-221.

- Tudoreanu L, Phillips CJC, 2004.** Empirical models of cadmium accumulation in maize, rye grass and soya bean plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 845-852.
- Turnau K, Kottke I, Oberwinkler F, 1993.** Element localization in mycorrhizal roots of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn collected from experimental plots treated with cadmium dust. *New Phytologist* 123: 313-324.
- Turner AP, 1994.** The responses of plants to heavy metals. In: Ross SM (Ed) *Toxic metals in soil-plant systems*. Wiley publishers, Chichester, pp. 153-187.
- Uehlein N, Fileschi K, Eckert M, Bienert GP, Bertl A, Kaldenhoff R, 2007.** Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. *Phytochemistry* 68: 122-129.
- Van Assche F, Clijsters H, 1986.** Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: effect on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Journal of Plant Physiology* 125: 355-360.
- Van der Vliet L, Peterson C, Hale B, 2007.** Cd accumulation in roots and shoots of durum wheat: the roles of transpiration rate and apoplastic bypass. *Journal of Experimental Botany* 58: 2939-2947.
- Van Nevel L, Mertens J, Oorts K, Verheyen K, 2007.** Phytoextraction of metals from soils: How far from practice? *Environmental Pollution* 150: 34-40.
- Verma P, George KV, Singh HV, Singh RN, 2007.** Modeling cadmium accumulation in radish, carrot, spinach and cabbage. *Applied Mathematical Modelling* 31: 1652-1661.
- Vivas A, Vörös A, Biró B, Barea JM, Ruiz-Lozano JM, Azcón R, 2003.** Beneficial effect of indigenous Cd-tolerant and Cd-sensitive *Glomus mosseae* associated with a Cd-adapted strain of *Brevibacillus* sp. in improving plant tolerance to Cd contamination. *Applied Soil Ecology* 24: 177-186.

- Vivas A, Barea JM, Azcón R, 2005.** Interactive effect of *Brevibacillus brevis* and *Glomus mosseae*, both isolated from Cd contaminated soil, on plant growth, physiological mycorrhizal fungal characteristics and soil enzymatic activities in Cd polluted soil. *Environmental Pollution* 134: 257-266.
- Wang F, Lin X, Yin R, 2005.** Heavy metal uptake by arbuscular mycorrhizas of *Elsholtzia splendens* and the potential for phytoremediation of contaminated soil. *Plant and Soil* 269: 225-232.
- Wang YP, Shi JY, Wang H, Lin Q, Chen XC, Chen YX, 2007.** The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67: 75-81.
- Weissenhorn I, Leyval C, Berthelin J, 1993.** Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy-metal polluted soils. *Plant and Soil* 157: 247-256.
- Weissenhorn I, Leyval C, 1995.** Root colonization of maize by a Cd-sensitive and a Cd-tolerant *Glomus mosseae* and cadmium uptake in sand culture. *Plant and Soil* 175: 233-238.
- Welch RM, Hart JJ, Norvell WA, Sullivan LA, Kochian LV, 1999.** Effects of nutrient solution zinc activity on net uptake, translocation, and root export of cadmium and zinc by separated sections of intact durum wheat (*Triticum turgidum* L. var *durum*) seedling roots. *Plant and Soil* 208: 243-250.
- White C, Sayer JA, Gadd GM, 1997.** Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. *FEMS Microbiology Reviews* 20: 503-516.
- Williams LE, Pittman JK, Hall JL, 2000.** Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 104-126.
- Wojcik M, Tukiendorf A, 2005.** Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays*. *Biologia Plantarum* 49: 237-245.

**World Health Organization (WHO), 2003.** Zinc in drinking-water. Background document for preparation of WHO guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization.

**World Health Organization (WHO), 2004.** Cadmium in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization.

**World Health Organization (WHO), 2006.** Guidelines for drinking-water quality, 3<sup>rd</sup> edition, 1<sup>st</sup> addendum.

**Wren CD, Harris S, Harttrup N, 1995.** Ecotoxicology of Mercury and Cadmium. In: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton Jr GA, Cairns Jr J (Eds) Handbook of Ecotoxicology. CRC Press, Boca Raton, pp 405-423.

**Wright SF, Upadhyaya A, 1998.** A survey of soils for aggregates stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 198: 97-107.

**Yang X, Feng Y, He Z, Stoffella PJ, 2005.** Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18: 339-353.

**Yang Y, Zhang FS, Li HF, Jiang RF, 2008.** Accumulation of cadmium in the edible parts of six vegetable species grown in Cd-contaminated soils. *Journal of Environmental Management*, doi:10.1016/j.jenvman.2008.05.004.

**Young SD, Tye A, Cartensen A, Resende L, Crout N, 2000.** Methods for determining labile cadmium and zinc in soil. *European Journal of Soil Science* 51: 129-136.

**Zhang H, Davison W, Miller S, Tych W, 1995.** In situ resolution measurements of fluxes of Ni, Cu, Fe, and Mn and concentrations of Zn and Cd in porewaters by DGT. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59: 4181-4192.

**Zhao Z-Q, Zhu Y-G, Cai Y-L, 2005.** Effects of zinc on cadmium uptake by spring wheat (*Triticum aestivum*, L.): long-time hydroponic study and short-time  $^{109}\text{Cd}$  tracing study. *Journal of Zhejiang University SCIENCE* 6A: 643-648.

# Liste des figures et tableaux



## Liste des figures et tableaux

### État des connaissances

**Figure 1** : Résumé des interactions connues mettant en jeu les espèces réactives de l'oxygène et leurs dégâts dans les tissus (Stohs et Bagchi, 1995).

**Figure 2** : Résumé des mécanismes cellulaires connus potentiellement impliqués dans la détoxification des métaux et la tolérance des plantes (Hall, 2002).

**Figure 3** : Isothermes d'adsorption du cadmium dans deux sols de textures différentes et à différents pH (Bradl, 2004).

**Figure 4** : Les différentes réponses des plantes à l'accroissement de la concentration des éléments en traces dans le sol (Bourrelier et Berthelin, 1998).

**Figure 5** : Absorption de  $Cd^{2+}$  en fonction de sa concentration en solution par des racines de plantules de blé tendre et de blé dur (Hart et al., 1998).

**Figure 6** : Mécanismes de transport du Cd dans les cellules racinaires.

**Figure 7** : Les différents types d'associations mycorhiziennes (d'après Selosse et Le Tacon, 1998).

**Figure 8** : Arbre phylogénétique des Glomeromycota basé sur l'analyse des séquences de la petite sous-unité ribosomale (dessiné d'après les définitions de Schwarzott et al., 2001).

**Figure 9** : Vue schématique du développement d'un champignon à travers les différentes couches cellulaires d'une racine et gènes de la plante impliqués dans la régulation des différentes étapes de la colonisation (d'après Parniske, 2004).

**Figure 10** : Transport et métabolisme de l'azote et du phosphore dans un système (racine de carotte transformée – champignon MA) (Jin et al., 2005).

**Tableau 1** : Contenu des roches en éléments traces (en ppm) (Kabata-Pendias et Pendias, 1992).

**Tableau 2** : Les sources d'éléments traces métalliques dans l'environnement (Ross, 1994).

**Tableau 3** : Valeurs seuils provisoires retenues au niveau national pour la définition de l'état chimique des eaux souterraines (Circulaire DCE 2006/18).

**Tableau 4** : Norme française relative aux boues des ouvrages de traitement des eaux usées urbaines (Arrêté du 02 février 1998).

**Tableau 5** : Teneurs maximales en plomb, cadmium et mercure autorisées dans différentes catégories d'aliments (EC n° 466/2001).

**Tableau 6** : Valeurs seuils dans les eaux de boissons recommandées par l'OMS (World Health Organization, 2006).

**Tableau 7** : Résumé des techniques de remédiation des sols pollués par les métaux.

### **Objectifs de l'étude**

**Figure 11** : Schéma illustrant l'influence possible d'un champignon mycorrhizien à arbuscule sur le transfert et le bilan de cadmium dans un système sol-plante-champignon.

### **Résultats et discussion**

#### Article 1 :

**Figure 1**: Shoot biomass and ratio of Cd shoot concentration to Cd soil concentration of mycorrhizal and non-mycorrhizal *M. truncatula* grown in the four studied soils.

**Table 1**: Soil characteristics

**Table 2:** Cd partitioning in mycorrhizal and non-mycorrhizal *M. truncatula* pots after 45 days of culture in the four studied soils.

**Figure 12 :** Schéma récapitulatif de l'expérience 1 : effets de l'inoculation mycorrhizienne sur le transfert de Cd par rapport à un système non mycorhizé.

Article 2 :

**Figure 1:** Shoot and root dry weights of 45-days old *Medicago truncatula* inoculated with different AM fungal isolates.

**Figure 2:** Total Cd content in shoots and roots of *Medicago truncatula* inoculated with different AM fungal isolates or not inoculated after 45 days or 30 days.

**Table 1:** Isolates of arbuscular mycorrhizal fungi used in the study.

**Table 2:** Mycorrhiza frequency, intensity of colonization, hyphal length and number of nodules per pot at harvest (after 30 or 45 days) in the different fungal inoculation treatments.

**Table 3:** Concentrations of metals (Cd, Zn, Pb) and phosphorus in shoots and roots of 45-days old *Medicago truncatula* inoculated with different AM fungal isolates or not inoculated.

**Table 4:** pH and Cd concentrations of leachates after 11, 24 and 39 days of culture.

Article 3 :

**Figure 1:** Depletion of  $^{109}\text{Cd}$  from solution by compartmented systems planted with *Medicago truncatula* at different ages.

**Figure 2:** Quantity of Cd sorbed by *Medicago truncatula* at different ages after subtraction of the mean quantity of Cd sorbed by non-planted systems.

**Table 1:** Shoot and root biomass of *Medicago truncatula* at different ages.

**Table 2:** Influx of Cd per plant dry weight per minute during 24h of sorption.

**Table 3:** Cd concentrations in shoots and roots of 45, 75, 100 and 150 days old *Medicago truncatula* after 24h of sorption, and desorbed radioactivity.

**Table 4:** Accumulation of total radioactivity and activity per fresh weight in 150 days-old *Medicago truncatula* and fungal mycelium (*Glomus intraradices*).

Article 4 :

**Figure 1:** Relative Cd distribution in three contaminated substrates assessed by sequential extraction procedure.

**Figure 2:** Relationships between the concentrations of  $^{109}\text{Cd}$  in shoots and roots, of mycorrhizal and non mycorrhizal *Medicago truncatula*, and the concentrations of  $^{109}\text{Cd}$  in fraction F1 (soluble-exchangeable Cd) of the sequential extraction.

**Figure 3:** Schematic representation of Cd uptake from three contrasted substrates by AM hyphae colonizing *Medicago truncatula*, mean hyphal length in the hyphal compartment and mycorrhizal effect on  $^{109}\text{Cd}$  total content in shoots and roots and on Root/Shoot ratio.

**Table 1:** Characteristics of the agricultural soil and of the substrates used in the experiment before dilution with sand.

**Table 2:** Shoot and root dry weights and parameters of root colonization of mycorrhizal and non mycorrhizal *Medicago truncatula* grown in compartmented pots with different Cd-contaminated substrates in hyphal compartment.

**Table 3:** Quantity of  $^{109}\text{Cd}$  transferred in shoots and roots of mycorrhizal and non mycorrhizal *Medicago truncatula* grown in compartmented pots with different Cd-contaminated substrates in hyphal compartment.

### **Discussion générale et perspectives**

**Figure 13 :** Influences globales de l'inoculation d'un champignon MA dans le système sol-plante en présence de concentrations élevées d'ETM.

**Figure 14 :** Mécanismes possibles de prélèvement et transport du cadmium par une racine mycorhizée.



# **Annexes**



## Annexe 1

## Estimation de la colonisation mycorhizienne

□ **Coloration des racines :**

1. Lavage à l'eau courante pour éliminer le sol adhérent

Coupe de fragment de 1 cm

Rinçage à l'eau courante

Racines dans pilulier

5 ml d'éthanol 50%

Laisser une nuit

2. Vider la solution d'éthanol au-dessus d'un tamis

5 mL de potasse KOH 5%

Laisser en contact 15 min

Bain marie pendant 15 min

Laisser refroidir

Rincer les racines 4-5 fois à l'eau du robinet

5 mL d'acide chlorhydrique HCl 1%

Laisser une nuit

3. Vider la solution d'HCl et la remplacer par la solution de bleu Trypan 0,5%

Laisser une demi journée

4. Vider la solution de bleu Trypan

Rincer les racines

5 mL de solution de décoloration (glycérol acidifié)

Laisser jusqu'à la préparation des lames

□ **Préparation des lames :**

5. Déposer sur une lame deux fois cinq fragments racinaires

Recouvrir de glycérol 50%

Recouvrir d'une lamelle

Luter les lames avec du vernis à ongle

Faire trois lames par plante

□ **Observations :**

Notation de l'infection mycorhizienne (5 classes) (Fréquence et intensité de la mycorhization)

Notation de la richesse en arbuscule (4 classes)

**Composition des solutions :**Solution de Bleu Trypan 0,5%

Glycérol 500mL

H<sub>2</sub>O 450mL

HCl (1%) 50mL

Bleu Trypan 0,5g

Solution de conservation

Ethanol 200mL

Formaldéhyde 13mL

Acide Acétique 95mL

Solution de décoloration

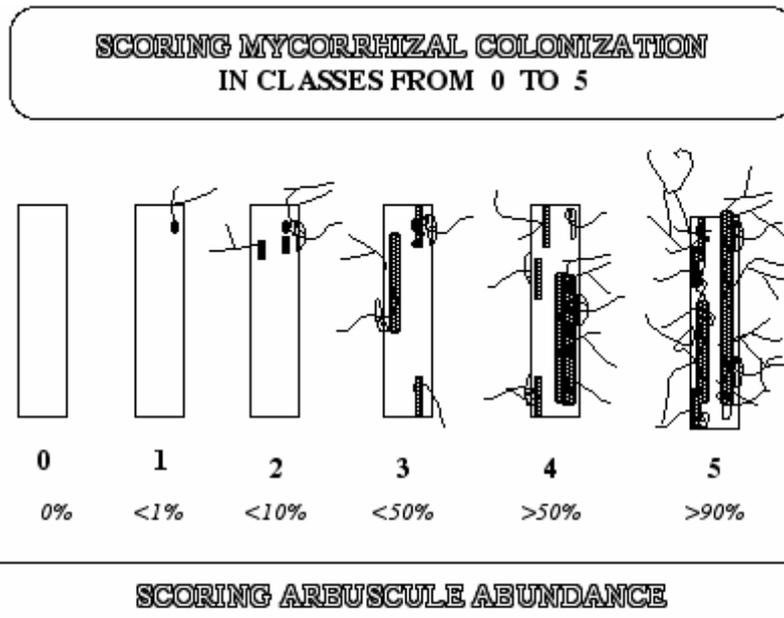
Glycérol 500mL

H<sub>2</sub>O 450mL

HCl (1%) 50mL

□ **Notations de l'infection mycorhizienne et de la richesse en arbuscules :**

Pour chaque fragment racinaire, on note l'infection mycorhizienne d'après la figure ci-dessous :



Les paramètres %F, %M, %m, %a et %A sont ensuite calculés d'après les formules suivantes:

# Fréquence des mycorhizes dans le système racinaire :

$$F\% = (\text{nb de fragments mycorhizés} / \text{nb total de fragments}) * 100$$

# Intensité de la colonisation mycorhizienne dans le système racinaire :

$$M\% = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / (\text{nb total})$$

où  $n_5$  = nombre de fragments classés 5 ;  $n_4$  = nombre de fragments classés 4 ; etc...

# Intensité de la colonisation mycorhizienne dans les fragments mycorhizés :

$$m\% = M\% * (\text{nb total}) / (\text{nb mycorhizés})$$

# Abondance en arbuscules dans les parties mycorhizées des fragments racinaires :

$$a\% = (100m_{A3} + 50m_{A2} + 10m_{A1}) / 100$$

où  $m_{A3}$ ,  $m_{A2}$ ,  $m_{A1}$  = % de m, classés A3, A2, A1, respectivement, avec

$$m_{A3} = ((95n_5A_3 + 70n_4A_3 + 30n_3A_3 + 5n_2A_3 + n_1A_3) / \text{nb myco}) * 100 / m ; \text{etc...}$$

# Abondance en arbuscules dans le système racinaire :

$$A\% = a * (M\% / 100)$$

## Annexe 2

Concentrations moyennes en Ca, K, Mg, P et Zn dans les parties aériennes (A) et les racines (B) des plantes cultivées lors de l'expérience 1 sur quatre sols contaminés en Cd et inoculées (M) ou non (NM) avec *Glomus intraradices*. Des tests de Mann-Whitney ont été effectués entre les traitements M et NM : ns = pas significativement différent, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

(A)

Sol	Traitement	Concentrations (mg g <sup>-1</sup> )				
		Ca	K	Mg	P	Zn
Exp-7.4	M	11.21 ± 0.37 ns	20.34 ± 1.33 ns	1.99 ± 0.16 *	4.64 ± 0.47 *	0.05 ± 0.00 **
	NM	10.83 ± 0.38	22.28 ± 1.72	2.42 ± 0.33	3.92 ± 0.31	0.03 ± 0.01
Hist-7.7	M	11.15 ± 0.56 ns	22.53 ± 2.65 ns	2.09 ± 0.14 **	3.79 ± 0.54 *	0.04 ± 0.01 **
	NM	11.88 ± 0.47	25.62 ± 1.57	2.97 ± 0.32	5.15 ± 0.33	0.06 ± 0.01
Hist-6.1	M	9.90 ± 0.56 ns	22.98 ± 2.60 ns	2.72 ± 0.41 **	6.39 ± 0.85 ns	0.28 ± 0.03 **
	NM	10.18 ± 0.32	23.76 ± 0.96	3.72 ± 0.14	6.95 ± 0.23	0.36 ± 0.04
Exp-5.3	M	10.35 ± 0.70 ns	28.31 ± 0.83 *	3.11 ± 0.18 **	4.68 ± 0.61 **	0.05 ± 0.01 **
	NM	11.03 ± 1.70	26.41 ± 0.88	3.74 ± 0.24	5.59 ± 0.35	0.08 ± 0.01

(B)

Sol	Traitement	Concentrations (mg g <sup>-1</sup> )				
		Ca	K	Mg	P	Zn
Exp-7.4	M	5.92 ± 0.45 ns	9.18 ± 0.43 **	2.03 ± 0.15 **	3.85 ± 0.19 **	0.11 ± 0.02 ns
	NM	6.09 ± 0.32	11.97 ± 1.54	3.02 ± 0.24	3.32 ± 0.14	0.09 ± 0.02
Hist-7.7	M	4.82 ± 0.17 ns	10.74 ± 1.05 **	2.21 ± 0.20 **	3.65 ± 0.46 **	0.29 ± 0.04 *
	NM	5.17 ± 0.80	22.55 ± 1.35	4.01 ± 0.31	5.82 ± 0.82	0.35 ± 0.06
Hist-6.1	M	3.55 ± 0.29 ns	16.36 ± 3.14 *	3.40 ± 0.32 *	6.69 ± 1.45 **	1.44 ± 0.23 ns
	NM	3.66 ± 0.10	21.23 ± 0.56	4.06 ± 0.29	9.32 ± 0.47	1.65 ± 0.12
Exp-5.3	M	4.39 ± 0.43 **	11.85 ± 0.56 **	1.76 ± 0.16 **	4.17 ± 0.39 **	0.10 ± 0.01 **
	NM	3.55 ± 0.17	19.18 ± 1.04	3.11 ± 0.64	5.54 ± 0.27	0.08 ± 0.01

## Annexe 3

pH des percolats récoltés après 0, 12, 26 et 40 jours après la mise en culture au cours de l'expérience 1, et pH des sols rhizosphériques à la fin de la culture, pour quatre sols contaminés en ETM cultivés avec des luzernes mycorhizées (M) ou non (NM). Les moyennes entre les traitements M et NM ont été comparées par le test de Tukey : ns = pas significativement différent, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Sol	Traitement	pH des percolats (jours après mise en culture)				pH du sol rhizosphérique en fin de culture
		0 j	12 j	26 j	40 j	
Exp-7.4	M	7,14 ± 0,06 ns	7,10 ± 0,06 ns	6,55 ± 0,25 **	6,81 ± 0,30 *	7,0 ± 0,1 ns
	NM	6,92 ± 0,07	7,00 ± 0,08	6,98 ± 0,13	7,15 ± 0,15	6,9 ± 0,1
Hist-7.7	M	7,06 ± 0,13 ns	7,13 ± 0,29 ns	6,75 ± 0,22 ns	7,31 ± 0,18 ns	7,1 ± 0,2 ns
	NM	7,11 ± 0,08	7,42 ± 0,27	7,16 ± 0,13	7,40 ± 0,31	7,3 ± 0,1
Hist-6.1	M	6,27 ± 0,09 ns	6,58 ± 0,11 ns	6,16 ± 0,24 ns	5,95 ± 0,26 ns	5,8 ± 0,1 ns
	NM	5,95 ± 0,28	6,69 ± 0,08	6,22 ± 0,10	6,19 ± 0,11	5,6 ± 0,1
Exp-5.3	M	5,30 ± 0,13 *	5,78 ± 0,12 ns	5,38 ± 0,08 **	6,08 ± 0,23 ns	5,2 ± 0,1 ns
	NM	4,95 ± 0,13	5,85 ± 0,13	5,75 ± 0,19	6,20 ± 0,11	5,1 ± 0,2

## Annexe 4

Détermination de la présence de bactéries nodulantes (PGPR) dans l'inoculum de *G.* intraradices et dans des racines présentant des nodules.

L'ADN total des échantillons à analyser est extrait.

Une PCR est ensuite réalisée avec les amorces décrites par Laguerre et al (2001) :

Primers	5'-3' nucleotide sequence*	
nodCF	AYGTHGTYGAYGACGGTTC	(forward primer)
nodCI	CGYGACAGCCANTCKCTATTG	(reverse primer)

\* Y = C or T ; H = A, C or T ; R = A or G ; S = C or G ; K = G or T ; N = A, C, G or T ; I = inosine.

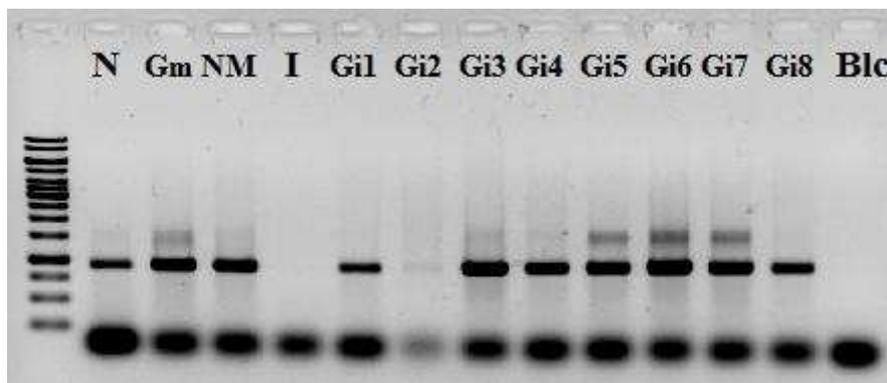
Programme PCR utilisé :

- 1 : [5min à 95°C]
- 2 : [45sec à 95°C, 1min à 55°C, 1min à 72°C] x 35 cycles
- 3 : [8min à 72°C]
- 4 : [conservation à 4°C]

Echantillons analysés :

N = ADN extrait de nodules ; I = ADN extrait de l'inoculum *G. intraradices* n°1 ; Gm = racines colonisées par *G. mosseae* présentant quelques nodules ; NM = racines non mycorhizées présentant des nodules ; Gi1 à Gi8 = racines mycorhizées par *G. intraradices* n°1 ; Blc = Blanc.

Résultat :



## Annexe 5

Culture test : effet de l'inoculation de *G. intraradices* sur la nodulation

Plante : *Medicago truncatula*

Sol : Exp-7.4 contaminé au CdSO<sub>4</sub> et stérilisé au four Pasteur

Culture de 4 semaines dans des pots de 500g

Traitements :

- inoculé avec *Glomus intraradices* n°1 seul
- réinoculé avec la microflore indigène du sol seule (solution de sol filtrée à 5µm)
- stérile

3 répétitions par traitement

Mesures :

- biomasses aérienne et racinaire
- nombre de nodules
- colonisation mycorhizienne (coloration au Bleu Trypan)

Résultats :

Traitement	Biomasse aérienne sèche (g)	Biomasse racinaire sèche (g)	Nodules par pot	Colonisation mycorhizienne		
				F%	M%	A%
Bactéries indigènes	0,13 ± 0,10	0,05 ± 0,04	0	0	0	0
<i>Glomus intraradices</i>	0,37 ± 0,05	0,12 ± 0,01	0	55 ± 28	14 ± 5	9 ± 3
Stérile	0,31 ± 0,08	0,13 ± 0,04	0	0	0	0

## Résumé

### **Rôle de champignons mycorhiziens à arbuscules dans le transfert du cadmium (Cd) du sol à la luzerne (*Medicago truncatula*).**

L'accumulation d'éléments en traces métalliques (ETM), dont le cadmium (Cd), dans les sols et leur transfert aux plantes sont problématiques à cause de leur toxicité. Les champignons mycorhiziens à arbuscules (MA), symbiontes des plantes, peuvent influencer le transfert des ETM de manière directe en les transportant jusqu'aux racines et de manière indirecte en favorisant la croissance de la plante. Des résultats divergents ont néanmoins été reportés et leur rôle global doit donc être éclairci. En prenant comme plante modèle la luzerne *Medicago truncatula*, l'effet d'un champignon MA (*Glomus intraradices*) sur le bilan de Cd dans la plante, le sol et les percolats a été étudié. La contribution du champignon au transfert de Cd a été évaluée dans des cultures en pot et des dispositifs à compartiment. Le champignon a principalement influencé la dynamique de Cd dans le système sol-plante de manière indirecte en améliorant fortement la croissance de la plante sur sol contaminé, conduisant à une quantité plus importante de Cd exporté dans les parties aériennes de la plante, bien que leur concentration en Cd soit plus faible que dans les plantes non mycorhizées. Cette forte augmentation de croissance de la luzerne par ce champignon est associée à la stimulation de bactéries formant des nodules. Cette influence mycorhizienne est néanmoins complexe, elle est variable selon les conditions édaphiques et selon l'isolat du champignon étudié. Le champignon MA contribue aussi directement au transfert de Cd en sorbant et en transportant le Cd soluble-échangeable par son mycélium extraracinaire, mais cette contribution directe semble être faible en comparaison de l'effet des racines.

**Mots-clés :** endomycorhizes à vésicules et arbuscules, cadmium, luzerne, sols, pollution, métaux lourds, phytoremédiation, rhizosphère.

## Abstract

### **Role of arbuscular mycorrhizal fungi on cadmium (Cd) transfer from soil to barrel medic (*Medicago truncatula*).**

Accumulation of trace metals, such as cadmium (Cd), in soils and their transfer to plants are serious environmental problems because of their acute toxicity. Metal mobility in soil depends on various abiotic and biotic factors. Among them, arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are known to influence metal transfer by transporting metals to roots and also by improving plant growth. However, diverging results were reported and the global role of AM fungi thus needed more investigation. The influence of an AM fungus (*Glomus intraradices*) on Cd uptake and transfer to leachates was studied with *Medicago truncatula* as a host plant. Experiments were performed in pot cultures and in compartmented devices. The dynamic of Cd in the soil-plant system was indirectly influenced by the fungus via a strong increase of plant biomass, in interaction with nodulating rhizobacteria, leading to a higher total quantity of Cd transferred to shoots although Cd plant concentration was lower than in non mycorrhizal plants. This fungal influence was complex, and was variable according to soil conditions and to the fungal isolate studied. The AM fungus also contributed directly to Cd transfer thanks to its sorption capacity and its ability to transport soluble-exchangeable Cd via the extraradical mycelium, but this direct contribution seemed to be low as compared to the influence of roots.

**Keywords:** arbuscular mycorrhiza, cadmium, trace metals, lucerne, soil, pollution, phytoremediation, rhizosphere.