Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Sélection de souches fongiques performantes dans la biosorption de 3 éléments traces métalliques (Cd, Cu et Pb) et étude de leur spéciation minéralogique en microcosme de sol

Présentée et soutenue par
Quentin ALBERT

Thèse soutenue publiquement le 05/02/2019 devant le jury composé de		
Mme ALEXANDRA COURTIN-NOMADE	Professeur des universités, Université de Limoges	Rapporteur du jury
M. YVES-FRANCOIS POUCHUS	Professeur des universités, Université de Nantes	Rapporteur du jury
Mme LYDIA LELEYTER REINERT	Maître de conférences, Université Caen Normandie	Membre du jury
Mme CATHERINE RAFIN	Maître de conférences HDR, Université Littoral Côte d'Opale	Membre du jury
M. DAVID GARON	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse
Mme FABIENNE BARAUD	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par DAVID GARON et FABIENNE BARAUD, Aliments bioprocédés toxicologie environnements

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

UR ABTE EA-4651
Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont soutenu au cours de ce travail. J'adresse mes remerciements et ma reconnaissance aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail: le Pr Alexandra COURTIN NOMADE, le Pr Yves-François POUCHUS et le Dr Catherine RAFIN.

Je remercie chaleureusement le Pr. David GARON, directeur de ce travail de thèse, pour m'avoir ouvert les portes de l'impressionnant monde fongique et qui s'est toujours rendu disponible et encourageant. Je remercie le Dr Fabienne BARAUD, co-directrice de thèse, pour ses conseils, avis et relectures. Je remercie le Dr Lydia LELEYTER-REINERT qui m'a encadré et formé à la géochimie. Leurs relectures ont été précises et précieuses. Je remercie les Dr Lucile SAGE et Jean-Philippe RIOULT pour les sorties de terrain et leur aide à la reconnaissance des micromycètes et macromycètes, une des premières étapes de ce travail. Merci à Natacha HEUTTE pour son aide sur les analyses statistiques.

Je tiens ensuite à remercier chaleureusement tous les membres des deux équipes de l'unité ABTE : EcoTEA et ToxEMAC, qui ont partagé mon quotidien depuis maintenant 3 ans. Merci au Pr François SICHEL, directeur d'ABTE, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire. Je remercie en particulier Mélanie LEMOINE, pour la qualité de son travail sur les analyses ICP, mais aussi pour sa bonne humeur et son soutien. Un très grand merci à tous les collègues rencontrés et pour les moments partagés : Jérôme L, David C, Véronique A, Ivannah P, Philippe EP, Virginie S, Stéphanie G, Carine L, Raphaël D, Mathilde L, Benoit B, Marielle LP, Antoine D, Simon R, Adeline C, Samia C, Hélèna A, Maryline G et Floriane C.

Merci aux amis plongeurs, pour leur soutien moral et les sorties subaquatiques, qu'elles soient techniques, exploratoires ou naturalistes (François S et Nicole B, Pierre S, François D, Marie-Christine L, Cyrille A, Bérengère B, Richard F, Philippe et Françoise R et tous les membres du CERSUB, Angélique C, Jérémy P). Merci aux membres du GRETIA, des Curieux de Nature et du CEN pour les sorties naturalistes plus forestières (Claire M, Loïc C, Sébastien E, Bernard M, Gabrielle T et Hubert P en particuliers). Merci pour les bons moments à bord de Brecqhou. Merci aux compagnons des premières heures que sont Julien B, Xavière E, Guillaume B, Renaud P. Merci à Anne D et Jean-Christophe G, Zouzou, Mamadou, Pépite, Julie.

Un énorme merci à mon frère et à Emilie pour leur présence et à Juliette, ma nièce haute comme trois pommes, pour sa complicité, sa joie de vivre, son espièglerie rigolote, les parties de cache-cache… Et globalement, merci à toute ma famille pour son indéfectible soutien.

Et merci aussi à toutes celles et ceux que j'ai oubliés…

Liste des communications

Communications affichées

Albert Q, Leleyter L, Lemoine M, Heutte N, Rioult J-P, Sage L, Baraud F, Garon D. Intérêt d'*Absidia cylindrospora* dans la biodépollution fongique des sols contaminés par les éléments traces métalliques (ETM) : Cd, Cu, Pb. **3ème Colloque International Francophone en Santé et Environnement**. Université du Littoral – Côte d'Opale. 23-25 octobre 2017.

Albert Q, Leleyter L, Lemoine M, Heutte N, Rioult J-P, Sage L, Baraud F, Garon D. Intérêt d'*Absidia cylindrospora* dans la biodépollution fongique des sols contaminés par les éléments traces métalliques (ETM) : Cd, Cu, Pb. **Sols Urbains et Biodiversité**. Institut de Formation en Environnement (IFORE), Ministère de l'Environnement, du Développement Durable et de l'Energie. 21 novembre 2017.

Albert Q, Leleyter L, Lemoine M, Heutte N, Rioult J-P, Sage L, Baraud F, Garon D. Sélection de souches fongiques efficaces dans la biosorption de Cd, Cu et Pb. Intérêt en mycoremédiation. **Journées d'études des sols.** Rouen, 9-12 juillet 2018.

Communication orales

Albert Q, Leleyter L, Lemoine M, Heutte N, Rioult J-P, Sage L, Baraud F, Garon D. Fungal bioremediation of trace metals. **21ème Journées de l'EDNBISE**. 22 -23 Mars 2018, Université de Rouen – Normandie. Conférence en anglais (1er prix du jury).

Albert Q, Leleyter L, Lemoine M, Heutte N, Rioult J-P, Sage L, Baraud F, Garon D. Screening of fungal isolates collected from polluted soils for the bioremediation of trace metals (Cd, Cu, and Pb). **Interfaces Against Pollution – IAP 2018**. La grande Motte, Université de Montpellier. 11-13 juin 2018.

Publications

Albert Q, Leleyter L, Lemoine M, Heutte N, Rioult J-P, Sage L, Baraud F, Garon D (2018) Comparison of tolerance and biosorption of three trace metals (Cd, Cu, Pb) by the soil fungus *Absidia cylindrospora*. Chemosphere 196:386–392.

Albert Q, Leleyter L, Lemoine M, Heutte N, Rioult J-P, Sage L, Baraud F, Garon D. Selection of soil fungi with high tolerance and biosorption of three trace metals (Cd, Cu, and Pb). A soumettre.

Albert Q, Leleyter L, Lemoine M, Heutte N, Rioult J-P, Sage L, Garon D, Baraud F. Impact of fungal bioaugmentation with *Absidia cylindrospora* in soil microcosm contaminated with trace metals. En préparation.

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

CEC : Capacité d'Echange Cationique

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC en anglais, pour International Agency for Research on Cancer).

COT : Carbone Organique Total

EDTA : Ethylene Diamine Tetracetic Acid

EPA : Environnemental Protection Agency

ETM : Eléments Traces Métalliques

GS : Galzy et Slonimski (milieu de)

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

ICP-OES : Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry

ITS : Internal Transcription Space

MEA : Malt Extract Agar (milieu de)

MPGT : Malt Peptone Glucose Tréhalose (milieu de)

NCBI : National Center for Biotechnology Information

PBDE : Poly Bromo Diphényl Ether

PCB : Poly Chloro Biphényles

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDA : Potato Dextrose Agar

RMQS : Réseau de Mesure de la Qualité des Sols

Table des matières

Remerciements 3
Liste des communications 4
Liste des abréviations 5
Table des figures 11
Table des tableaux 14

Introduction générale 17

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique 21
I. Les sols et la problématique des sols pollués 22
I.1. Définition générale 22
I.2. Eléments solides 23
I.2.1. Les minéraux 25
I.2.2. La fraction organique abiotique 26
I.3. Paramètres physico-chimiques 27
I.4. Eléments biotiques 28
I.5. Les pressions et les contaminations 30
I.5.1. Situation mondiale 32
I.5.2. Situation européenne 32
I.5.3. Situation française 33
II. Eléments traces métalliques 36
II.1. Définition et liens avec le sol 36
II.2. Cadmium (Cd) 40
II.2.1. Sources, usages et émissions 40
II.2.2. Transferts et potentiel toxique 41
II.3. Cuivre (Cu) 43
II.3.1. Sources, usages et émissions 44
II.3.2. Transferts et potentiel toxique 44
II.4. Plomb (Pb) 47
II.4.1. Sources, usages et émissions 47
II.4.2. Transferts et potentiel toxique 48
III. Techniques d'étude des métaux dans les sols 51
III.1. Minéralisation totales ou pseudo-totales 51
III.2. Extractions simples 52
III.3. Extractions séquentielles 53
III.4. Dosage des éléments par ICP-OES 55
III.5. Etudes des impacts environnementaux 55
IV. Remédiation des sols contaminés et intérêt du monde fongique 56
IV.1. Introduction 56

IV.2. Techniques biologiques 56
IV.3. Intérêts des champignons en bioremédiation 59
IV.3.1. Particularités et diversité du monde fongique 59
IV.3.2. Métabolisme fongique 62
IV.4. Potentiel pour la bioremédiation des métaux 63
V. Conclusion 68
VI. Objectifs et démarche scientifique de la thèse 69

Chapitre 2 : Matériel et méthodes 71
I. Caractérisation d'isolats fongiques 72
I.1. Méthode par incorporation directe 72
I.2. Méthode des suspensions-dilutions 73
I.3. Récolte et mise en culture des sporophores forestiers 73
I.4. Identification des champignons 74
I.4.1. Approche culturale et microscopique 74
I.4.2. Approche moléculaire 75
I.4.2.1. Extraction d'ADN fongique 75
A partir d'une culture pure 75
A partir d'un échantillon de sol 76
I.4.2.2. PCR 76
I.4.2.3. Séquençage 79
II. Etude des interactions entre les isolats fongiques et les métaux 80
II.1. Essai de tolérance en milieu gélosé 80
II.1.1. Préparation des géloses enrichies en métaux 80
II.1.2. Ensemencement et suivi de la croissance 81
II.2. Essai de biosorption en milieu liquide 82
II.2.1. Mise au point avec *Absidia cylindrospora* 82
II.2.2. Screening des 28 isolats fongiques 83
II.2.3. Paramètres mesurés 84
II.2.3.1. pH 84
II.2.3.2. Biomasse fongique 84
II.2.3.3. Métaux biosorbés 84
II.3. Essais de mycoremédiation en microcosmes de sol 85
II.3.1. Préparation des microcosmes 86
II.3.1.1. Mise au point de l'essai 86
II.3.1.2. Protocole appliqué lors de notre étude 87
II.3.2. Paramètres mesurés 87
II.3.2.1. Carbonates 88

II.3.2.2. Carbone organique total (COT) 88
II.3.2.3. Mesure du pH 89
II.3.2.4. Espèces fongique viables (microfonge) 89
II.3.2.5. Eléments traces métalliques 89
II.3.2.6. Evaluation de l'écotoxicité 90
III. Analyse des éléments métalliques 91
III.1. Minéralisation acide 91
III.2. Extraction séquentielle 92
III.3. Spectrométrie d'émission atomique avec plasma couplé induit 93
IV. Analyses statistiques 95

Chapitre 3 : Résultats et discussion 97
I. Champignons isolés de sols et intégrés à l'étude 98
II. Etude des interactions entre les isolats fongiques et les métaux 104
II.1. Essais de tolérance en milieu gélosé 104
II.1.1. Tolérance d'*Absidia cylindrospora* vis-à-vis de Cd, Cu et Pb. 105
II.1.2. Tolérance des 28 isolats de l'étude vis-à-vis de Cd, Cu et Pb. 108
Cas du cadmium 111
Cas du cuivre 114
Cas du plomb 117
II.1.3. Conclusion 121
II.2. Essai de biosorption en milieu liquide 122
II.2.1. Etude préliminaire avec *Absidia cylindrospora* 122
II.2.1.1. Evolution de la biomasse et du pH 122
Cas du cadmium 124
Cas du cuivre 125
Cas du plomb 125
II.2.1.2. Conclusion 126
II.2.1.3. Evaluation des capacités de biosorption 126
Cas du cadmium 128
Cas du cuivre 128
Cas du plomb 129
II.2.2. Discussion 129
II.2.3. Conclusion 132
II.2.4. Application aux 28 isolats fongiques de l'étude 132
II.2.4.1. Evolution du pH et de la biomasse 137
Cas du cadmium 137
Cas du cuivre 138

Cas du plomb 138
Conclusion 139
II.2.4.2. Evaluation des capacités de biosorption 139
Cas du cadmium 143
Cas du cuivre 145
Cas du plomb 148
II.2.4.3. Conclusion 149
II.2.5. Sélection des isolats pour les essais en microcosmes 151
II.3. Essais en microcosme de sol 153
II.3.1. Caractérisation du sol utilisé pour les essais en microcosme 153
Caractérisation microbiologique 153
Caractérisation physico-chimique 154
II.3.2. Evolution des microcosmes 159
Suivi microbiologique 159
Suivi physico-chimique 164
Evolution des spéciations minéralogiques des métaux 166
Cas du Cadmium 168
Cas du Cuivre 171
Cas du Plomb 173
Cas des autres métaux (Ca, Cr, Mg, Fe, Ni, Zn) 175
II.3.3. Discussion 176
II.3.4. Essai de germination 180
II.3.5. Conclusion 181
Conclusion générale et perspectives 183

Références bibliographiques 187
Liste des normes 202
Annexes 203
Annexe I : composition des milieux de culture 204
Annexe II : protocoles détaillés de biologie moléculaire 206
Annexe III : séquences ITS obtenues pour les 28 isoltas de l'étude 209
Annexe IV : profils de tolérance au stress induit par Cd, Cu et Pb, en milieu gélosé, des 28 isolats de l'étude 213
Annexe V : tableau de résultats de l'étude préliminaire 243
Annexe VI : tableaux de résultats de l'étude de biosorption en milieu liquide 245
Annexe VII : photographies des microcosmes 253
Annexe VIII : influence de l'apport en métaux sur les microcosmes 255
Annexe IX : tableaux de résultats des extractions séquentielles de métaux 257
Annexe X : publication n°1 portant sur l'étude préliminaire avec *A. cylindrospora* 269
Annexe XI : publication n°2 portant sur l'étude de biosorption en milieu liquide des 28 isolats fongiques 277

Table de Figures

Figure 1 : organisation classique d'un sol (profil) où les principaux horizons sont bien visibles, ainsi que la roche mère (R). L'horizon A correspond à une zone riche en matière organique, l'horizon B une zone intermédiaire, l'horizon C représente la zone d'altération de la roche-mère. L'échelle est donnée à titre indicatif, le plus souvent, on représente ainsi le premier mètre de sol (d'après European Commission et al. 2016)..... 23
Figure 2 : relations schématiques entre services écosystémiques, fonctions et biologie des sols (European Commission et al. 2016)..... 29
Figure 3 : exemple des nombreuses pressions subies par les sols et engendrées par les activités humaines (d'après European Commission et al. 2016). 30
Figure 4 : principaux sites pollués en France recensés en 2015. Cette carte montre la concentration de ces sites en lien avec l'histoire industrielle du territoire métropolitain (ADEME 2015). 35
Figure 5 : schéma du cycle général des métaux dans l'environnement (d'après Das, 2014). 37
Figure 6 : représentation schématique des fractions totales, résiduelles, potentiellement disponibles et biodisponibles d'un sol. 38
Figure 7 : part, en pourcentage, des différents apports de métaux et métalloïdes aux sols agricoles. 39
Figure 8 : teneur en Cd ($mg.kg^{-1}$) dans la partie superficielle des sols en France métropoliataine. 43
Figure 9 : teneur en Cu dans la partie superficielle des sols en France métropoliataine. 46
Figure 10 : teneur en Pb dans la partie superficielle des sols en France métropolitaine. 49
Figure 11 : schéma général du projet de thèse représentant la démarche et les principales étapes de travail. 70
Figure 12 : sporophores de *Megacollybia platyphylla* dans leur milieu forestier naturel (A) et mycélium purifié sur milieu MEA (B). (Source : laboratoire ToxEMAC, Albert) 74
Figure 13 : schéma de l'expérience de tolérance en milieu gélosé. La photographie représente *A. cylindrospora* sur boîte de Petri (milieu MEA). 82
Figure 14 : schéma de l'expérience de biosorption en milieu liquide avec *Absidia cylindrospora* ; photo A : *A. cylindrospora* sur boîte de Petri (milieu MEA) ; photo B : structures microscopiques d'*A. cylindrospora* (×1000) (d'après Albert et al. 2018). 83
Figure 15 : mode de préparation d'un microcosme de sol avec *Absidia cylindrospora*..... 87
Figure 16: schéma du montage pour la détermination de la teneur en $CaCO_3$ d'un sol. 88
Figure 17 : déroulement du test de germination. 91
Figure 18 : profils de tolérance d'*Absidia cylindrospora* en milieu gélosé (MEA) enrichi en Cd (A), Cu (B) et Pb (C)..... 107
Figure 19 : exemples de mycéliums d'*A. cylindrospora* en condition optimale de croissance (A) et soumis à des conditions de stress métalliques par Cd (B), Cu (C) et Pb (D). Des perturbations morphologiques sont visibles. Les filaments mycéliens sont moins nombreux, moins aériens et moins denses (Source : ToxEMAC, Albert). 108
Figure 20 : exemples de profils de tolérance au Cd de 3 isolats fongiques de notre étude : *Agaricus bisporus* (A), *Coprinellus micaceus* (B) et *Ganoderma resinaceum* (C). 112
Figure 21 : exemples de modifications morphologiques engendrées par différentes concentrations de Cd en milieu gélosé, chez 4 isolats de l'étude : *Absidia cylindrospora* [témoin sans métal (A) et Cd 1000 $mg.L^{-1}$ (B)] ; *Chaetomium atrobrunneum* [témoin (C) et Cd 50 $mg.L^{-1}$ (D)] ; *Perenniporia fraxinea* [témoin (E) et Cd 10 $mg.L^{-1}$ (F)] et *Humicola* sp [témoin (G) et Cd 10 $mg.L^{-1}$ (H)]..... 113
Figure 22 : exemples de profils de tolérance au Cu de 3 isolats de notre étude : *Agaricus bisporus* (A), *Coprinellus micaceus* (B) et *Ganoderma resinaceum* (C). 115
Figure 23 : exemples de modifications morphologiques engendrées par différentes concentrations de Cu en milieu gélosé, chez 4 isolats de l'étude : *Absidia cylindrospora* [témoin sans métal (A)

et Cu 50 mg.L^{-1} (B)] ; *Pleurotus pulmonarius* [témoin (C) et Cu 50 mg.L^{-1} (D)] ; *Xylaria* sp [témoin (E) et Cd 50 mg.L^{-1} (F)] et *Humicola* sp [témoin (G) et Cu 50 mg.L^{-}1(H)]..... 116
Figure 24 : exemples de profils de tolérance au Pb de 3 isolats de notre étude : *Agaricus bisporus* (A), *Coprinellus micaceus* (B) et *Ganoderma resinaceum* (C). 119
Figure 25 : exemples de modifications morphologiques engendrées par différentes concentrations de Pb en milieu gélosé, chez 4 isolats de l'étude : *Absidia cylindrospora* [témoin sans métal (A) et Pb 100 mg.L^{-1} (B)] ; *Chaetomium gracile* [(témoin (C) et Pb 100 mg.L^{-1} (D)] ; *Perenniporia fraxinea* [témoin (E) et Pb 1000 mg.L^{-1} (F)] et *Penicillium oxalicum* [témoin (G) et Pb 1000 mg.L^{-1})]. 120
Figure 26 : évaluation de la biomasse fongique d'*A. cylindrospora* après exposition aux métaux en milieu liquide. Les pourcentages représentent la masse de mycélium produite par l'isolat par rapport au témoin (sans métal) dans les mêmes conditions..... 122
Figure 27 : pourcentages de biosorption et d'absorption des métaux par *Absidia cylindrospora* selon les différentes conditions d'exposition (d'après Albert et al., 2018)..... 127
Figure 28 : quantité de métal biosorbé en fonction de la biomasse sèche produite par Absidia cylindrospora selon les différentes conditions d'exposition (d'après Albert et al., 2018). . 127
Figure 29 : pourcentages de métal biosorbé après 3 jours d'exposition à 50 mg.L^{-1} de Cd (A), Cu (B), et Pb (C). 141
Figure 30 : concentration de métal biosorbé après 3 jours d'exposition à 50 mg.L^{-1} de Cd(A), Cu (B), et Pb (C). 142
Figure 31 : spéciations minéralogiques des métaux dans le sol contaminé utilisé pour les essais en microcosme..... 158
Figure 32 : photographies des microcosmes au début de l'essai (J0) et à la fin de l'expérience (J20) montrant le développement fongique pour le microcosme témoin (AJ0 et AJ20), le microcosme biostimulé (BJ0 et BJ20) et le microcosme bioaugmenté avec *A. cylindrospora* (CJ0 et CJ15). Des détails de ce dernier microcosme en fin d'expérience sont présentés (DJ20 et EJ20). 161
Figure 33 : photographie des amplicons obtenus par PCR à partir des ADN totaux des microcosmes (J0 et J20) témoin, biostimulé et bioaugmenté par *Absidia cylindrospora* après électrophorèse sur gel d'agarose 1%. 164
Figure 34 : répartition de Cd au sein des différentes fractions labiles des sols des microcosmes. 169
Figure 35 : répartition de Cu au sein des différentes fractions labiles des sols des microcosmes. 172
Figure 36 : répartition de Pb au sein des différentes fractions labiles des sols des microcosmes. 174
Figure 37 : photographies des essais de germination après 4 jours d'incubation. A1 : témoin terreau, A2 : témoin sable, B : sol pollué, C : microcosme témoin, D : microcosme biostimulé, E : microcosme bioaugmenté avec *A. cylindrospora*. 181
Figure 38 : profil de tolérance d'*Absidia cylindrospora* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 215
Figure 39 : profil de tolérance d'*Agaricus arvensis* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. .. 216
Figure 40 : profil de tolérance d'*Agaricus bisporus* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.. 217
Figure 41 : profil de tolérance de *Chaetomium atrobrunneum* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 218
Figure 42 : profil de tolérance de *Chaetomium gracile* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 219
Figure 43 : profil de tolérance de *Coniochaeta hoffmanii* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 220
Figure 44 : profil de tolérance de *Coprinellus micaceus* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 221
Figure 45 : profil de tolérance de *Coprinellus xanthothrix* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 222
Figure 46 : profil de tolérance de *Emericellopsis minima* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 223

Figure 47 : profil de tolérance de *Fomes fomentarius* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 224
Figure 48 : profil de tolérance de *Fusarium oxysporum* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 225
Figure 49 : profil de tolérance de *Ganoderma resinaceum* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 226
Figure 50 : profil de tolérance de *Humicola fuscoatra* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 227
Figure 51 : profil de tolérance de *Humicola* sp en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb..... 228
Figure 52 : profil de tolérance de *Irpex lacteus* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 229
Figure 53 : profil de tolérance de *Laetiporus sulphureus* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 230
Figure 54 : profil de tolérance de *Megacollybia platyphylla* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 231
Figure 55 : profil de tolérance de *Penicillium oxalicum* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 232
Figure 56 : profil de tolérance de *Perenniporia fraxinea* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 233
Figure 57 : profil de tolérance de *Petriella* sp en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 234
Figure 58 : profil de tolérance de *Phaeophlebiopsis peniophoroides* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 235
Figure 59 : profil de tolérance de *Pleurotus ostreatus* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 236
Figure 60 : profil de tolérance de *Pleurotus pulmonarius* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 237
Figure 61 : profil de tolérance de *Psathyrella candolleana* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 238
Figure 62 : profil de tolérance de *Pseudeurotium bakeri* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 239
Figure 63 : profil de tolérance de *Schizophyllum commune* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb. 240
Figure 64 : profil de tolérance de *Sordaria lappae* en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.... 241
Figure 65 : profil de tolérance de *Xylaria* sp en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb..... 242
Figure 66 : photographies des microcosmes à J0 et J20 montrant le développement fongique après bioaugmentation avec *C. atrobrunneum* (A) et bioaugmentation *C. micaceus* (B). 254
Figure 67 : répartition de Ca, Cr, Fe, Mn, Ni et Zn au sein des différentes fractions potentiellement labiles des sols des microcosmes 268

Table des tableaux

Tableau 1 : catégories et concentrations de quelques éléments, par ordre d'abondance, au sein de la croûte terrestre (d'après Leleyter-Reinert 2017). 24
Tableau 2 : évaluation du nombre de sites contaminés dans quelques régions et pays du monde et part des sites contaminés par les métaux (d'après He et al., 2015). 32
Tableau 3 : nombre de sites concernés par des pollutions métalliques, des hydrocarbures ou des HAP d'après les données de BASOL. 34
Tableau 4 : exemple de valeurs de référence pour interpréter les concentrations en métaux dans les sols en France métropolitaine (Mench and Baize 2004; Baize et al. 2007). 38
Tableau 5 : revue non exhaustive de la littérature scientifique concernant la biosorption des métaux (en particulier Cd, Cu et Pb) par des espèces fongiques. 67
Tableau 6 : valeurs cibles et interprétation des ratios calculés à partir des absorbance des extraits d'ADN à 230, 260 et 280 nm. 76
Tableau 7 : préparation du mélange pour PCR avec de l'ADN pur. 77
Tableau 8 : liste des amorces, et séquences correspondantes, utilisées dans nos travaux. 78
Tableau 9 : préparation du mélange pour PCR avec de l'ADN extrait à partir de sol. 78
Tableau 10 : programmation des cycles de PCR. 79
Tableau 11 : données de préparation des solutions mères de sels de métaux. 81
Tableau 12 : paramètres testés pour la mise au point de l'essai en microcosme de sol pollué. 86
Tableau 13 : composition du sol ISO reconstitué selon la norme NF ISO 11269-1. 90
Tableau 14 : protocole de l'extraction séquentielle (d'après Leleyter and Probst 1999). 92
Tableau 15 : valeurs des Limites de Détection (LD) et des Limites de Quantifications (LQ) pour les métaux dosés par ICP-OES. 93
Tableau 16 : longueurs d'onde utilisées pour doser les métaux et comparaison de la méthode analytique utilisée avec les matériaux certifiés de référence. 94
Tableau 17 : origine, taxonomie et conditions de culture des isolats fongiques intégrés à l'étude. 99
Tableau 18 : concentrations maximales de Cd, Cu et Pb tolérées en milieu gélosé (MEA) par les 28 isolats de l'étude. 109
Tableau 19 : répartition des isolats fongiques en fonction de leur tolérance aux métaux. 110
Tableau 20 : moyennes des valeurs de pH au cours de l'expérience en milieu liquide (3 réplicats). Les écart-types sont donnés entre parenthèse. 123
Tableau 21 : biomasses mesurées à l'issue des 3 jours d'exposition du screening. 133
Tableau 22 : variations de pH et production de biomasse au cours du screening des différents groupes taxonomiques en milieu liquide. 135
Tableau 23 : variations de pH et productions de biomasse obtenues au cours du screening des 28 isolats fongiques. 136
Tableau 24 : synthèse des résultats concernant le pourcentage et la concentration de métal biosorbé au cours du screening des 28 isolats fongiques. 140
Tableau 25 : isolats à haut potentiel de bioremédiation selon des critères de biosorption, tolérance et biomasse. 152
Tableau 26 : caractéristiques du sol pollué utilisé pour les essais en microcosme. 154
Tableau 27 : concentrations totales et pourcentages des fractions potentillement mobiles des métaux du sol pollué utilisé pour les essais en microcsomes. 155
Tableau 28 : espèces fongiques identifiées en surface des microcosmes après les essais de bioaugmentation ou de biostimulation (20 jours). 162
Tableau 29 : valeurs des principaux paramètres physico-chimiques mesurés au sein des microcosmes. 165
Tableau 30 : évolution de la fraction potentiellement mobile en $mg.kg^{-1}$ 1687

Tableau 31 : évolution de la fraction potentiellement mobile en pourcentage des teneurs totales.. 1678
Tableau 32 : liste des séquences ITS obtenues lors du séquençage des amplicons d'ADN des isolats de l'étude. 210
Tableau 33 : production de biomasse (en mg) après exposition aux métaux. 244
Tableau 34 : résultats de biomasse et de biosorption obtenu avec *Absidia cylindrospora* lors de l'étude préliminaire. 244
Tableau 35 : masse moyenne de mycélium (mg, masse sèche) produit par les 28 isolats au cours de l'étude de screening. 246
Tableau 36 : résultats de biosorption après exposition des isoltas fongiques au Cd (50 $mg.L^{-}$)^{1} pendant 3 jours à 20°C. 247
Tableau 37 : résultats de biosorption après exposition des isoltas fongiques au Cu (50 $mg.L^{-}$)^{1} pendant 3 jours à 20°C. 249
Tableau 38 : résultats de biosorption après exposition des isoltas fongiques au Pb (50 $mg.L^{-}$)^{1} pendant 3 jours à 20°C. 251
Tableau 39 : apport en éléments minéraux dû au milieu de culture apporté au microcosme. 256
Tableau 40 : répartition (%) de Cd au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme. ... 258
Tableau 41 : répartition (%) de Cu au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme. ... 259
Tableau 42 : répartition (%) de Pb au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme. ... 260
Tableau 43 : répartition (%) de Ca au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme. ... 261
Tableau 44 : répartition (%) de Cr au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme. 262
Tableau 45 : répartition (%) de Fe au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme..... 263
Tableau 46 : répartition (%) de K au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme. 264
Tableau 47 : répartition (%) de Mn au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme... 265
Tableau 48 : répartition (%) de Ni au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme. 266
Tableau 49 : répartition (%) de Zn au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme. ... 267

Introduction générale

Introduction générale

En 2015, dans le contexte de l'année internationale des sols et de la COP21, la notion de services écosystémiques rendus par les sols est devenue importante pour le public. Les conséquences de l'utilisation illimitée et non durable des écosystèmes sont maintenant visibles : la plupart des ressources, dont les sols, sont fragilisées, voire menacées. Les différents déchets et pollutions issus des activités humaines ont des répercussions néfastes sur la biodiversité, le fonctionnement des écosystèmes et à plus long terme, sur la santé (Lucas et al. 2012 ; EEA 2015 ; Jean et al. 2018). Une gestion durable et globale, en particulier des sols, support de la biosphère et des activités humaines, devient aujourd'hui primordiale (Stolte, 2015 ; Paya Perez et al. 2017). Le sol est une interface entre les différents compartiments environnementaux (air, eau) : il reçoit à ce titre les pollutions et les redistribue à tous les écosystèmes et en particulier au compartiment aquatique. Les pollutions sont souvent complexes et difficiles à prendre en charge, en particulier les pollutions dues aux métaux (Bert, 2013).

Les métaux, ou Eléments Traces Métalliques (ETM) sont naturellement présents dans les sols et participent à des cycles biogéochimiques complexes (Baize et al. 2011). Ils représentent des polluants rémanents, souvent difficiles à prendre en charge en raison de leur mobilité et de leur toxicité très variables selon l'élément considéré et les conditions environnementales. Les activités humaines peuvent perturber ces cycles en favorisant l'apport excédentaires de métaux dans les sols et sur de courtes périodes de temps. Cela a pour conséquence de favoriser leur accumulation au sein de l'environnement et des chaînes trophiques. Des efforts ont été faits dans certains domaines pour limiter les émissions. Mais en raison de leur rémanence, les apports excédentaires passés sont toujours aujourd'hui à l'origine de conséquences environnementales importantes (cas du plomb par exemple) (Tremel-Schaub et al. 2005). En France ainsi qu'au niveau mondial, les ETM restent la deuxième source de pollution des sols après les hydrocarbures ; les quantités totales rejetées dans l'environnement ont été multipliées par 3 depuis le début de l'ère industrielle (Baize et al. 2011; ADEME 2014; Stolte et al. 2015; ADEME 2015).

Devant la diversité des polluants et la complexité de prise en charge, de nombreuses techniques de dépollution existent. Ces techniques peuvent utiliser un procédé physico-chimique et/ou biologique,

être mises en œuvre *in situ, ex situ,* ou être utilisées hors sol. Aucune méthode physico-chimique ou biologique de remédiation n'est à ce jour idéale. Les méthodes physico-chimiques sont le plus souvent coûteuses et présentent parfois des effets indésirables. De plus, l'efficacité et le faible impact écologique qu'offrent certaines méthodes biologiques, basées sur les capacités "épuratrices" de certains organismes dont les microorganismes, soutiennent leur développement pour la prise en charge des sites et sols pollués. De plus en plus de stratégies de remédiation ne visent plus à retirer les toxiques (ce qui est parfois complexe ou impossible sans excavation) mais cherchent plutôt à gérer le risque toxique en immobilisant les polluants sous des formes non transférables (accumulation dans un organisme qui les séquestre ou transformation en formes chimiques inertes), les rendant ainsi moins mobiles et moins (bio)disponibles. C'est, par exemple, le cas de la phytostabilisation qui utilise des végétaux capables de stocker les métaux dans leurs racines (Colombano 2010; Bert 2013; Dumat and Austruy 2014; Cristaldi et al. 2017).

D'autres organismes eucaryotes présentent un important potentiel dans ce domaine ; ce sont les champignons. En effet, le mycélium, qui est la partie végétative du champignon, constitue un immense réseau cellulaire interconnecté en trois dimensions qui explore le sol et qui peut atteindre des tailles impressionnantes. Par ailleurs, leur mode de nutrition, basé sur la sécrétion d'enzymes extracellulaires capable de dégrader des molécules complexes, permet d'envisager leur utilisation pour la dégradation de polluants. Ces deux caractéristiques font des champignons des organismes capables de s'adapter et d'explorer tous les environnements, même les plus extrêmes ou les plus contaminés. Leur capacité à bioaccumuler certains xénobiotiques par absorption et/ou adsorption, notamment les métaux, est connue depuis longtemps (Gadd 1994; Volesky and Holan 1995; Baldrian 2003). Leur grande diversité structurale et physiologique, tout comme leur très grande capacité d'adaptation les font apparaître comme une solution potentielle à la bioremédiation de sites pollués par des contaminants organiques et/ou inorganiques (Stamets 2005; Singh 2006; Ali et al. 2017).

Les objectifs de ce travail de thèse sont d'identifier et de tester des isolats fongiques d'origine tellurique vis-à-vis de la biosorption de trois éléments : Cd, Cu et Pb, qui sont des polluants majeurs de l'environnement. Il s'agit d'un travail collaboratif et transdisciplinaire associant mycologie et géochimie

entre deux équipes de l'unité Aliments, Bioprocédés, Toxicologie, Environnement (ABTE - EA4651) de l'Université de Caen Normandie.

Pour remplir ces objectifs, trois volets ont été développés. Le premier a pour objectif d'évaluer la croissance d'isolats fongiques en présence des toxiques Cd, Cu et Pb (étude de tolérance en milieu gélosé). Le second évalue les capacités de biosorption des isolats vis-à-vis de ces trois métaux (étude de biosorption en milieu liquide). Ces expériences ont d'abord été développées avec *Absidia cylindrospora*, micromycète modèle du laboratoire, déjà étudié pour ses propriétés de biodégradation d'un HAP, le fluorène (Garon et al. 2000). Les protocoles sont ensuite appliqués aux 28 isolats fongiques (micro et macromycètes) isolés de sols. Le troisième volet a consisté à évaluer l'impact du développement de trois champignons (sélectionnés suite aux essais de tolérance et de biosorption) sur les spéciations minéralogiques des trois métaux en microcosme de sol.

Chapitre 1 :

Synthèse bibliographique

I. Les sols et la problématique des sols pollués

I.1. Définition générale

L'Association Française pour l'Etude des Sols (AFES) a proposé en 2014 la définition suivante : « le sol est un volume qui s'étend depuis la surface de la Terre jusqu'à une profondeur marquée par l'apparition d'une roche[1] dure ou meuble, peu altérée, ou peu marquée par la pédogénèse[2]. L'épaisseur du sol peut varier de quelques centimètres à quelques dizaines de mètres, ou plus. Il comporte le plus souvent plusieurs horizons[3] correspondant à une organisation des constituants organiques et/ou minéraux (la terre). Cette organisation est le résultat de la pédogénèse et de l'altération du matériau parental. Il est le lieu d'une intense activité biologique (racines, faunes, et micro-organismes) » (Baize et al. 2011). Cette définition est en accord avec la norme NF ISO 17402 2011. La figure 1 présente l'organisation d'un sol en différents horizons et montre l'altération progressive de la roche parentale. Cette définition implique que le sol est **dynamique et vivant**. En effet, il abrite la plupart de la biodiversité terrestre : 1 cuillère à café de sol contiendrait plus d'êtres vivants que d'êtres humains sur Terre (European Commission et al. 2016). Le sol est globalement composé de 25% d'air, 25% d'eau, 45% de minéraux et 5% de matière organique.

Le processus de formation des sols est long, il faut parfois plusieurs milliers d'années pour la formation d'un centimètre de sol (Baize et al. 2011). Sa dégradation peut en revanche être très rapide. En particulier, les sols sont le réceptacle de nombreuses pollutions d'origine anthropique. Ils peuvent alors devenir des réservoirs de ces pollutions, voire des sources d'émissions secondaires et d'exposition de la biosphère et des populations (Vasseur et al. 2008 ; Lucas et al. 2012 ; Jean et al. 2018). Les sols

[1] Cette roche est appelée « roche-mère » ou « matériau parental ».
[2] La pédogénèse regroupe l'ensemble des phénomènes qui concourent à la formation du sol. Elle se fait en général à partir de la roche-mère située sous les sols.
[3] Un horizon de sol est une couche de sol homogène quant à ses différentes propriétés physico-chimiques.

présentent une grande diversité structurelle et fonctionnelle. Ces structures et fonctions évoluent au cours du temps (Girard et al. 2010).

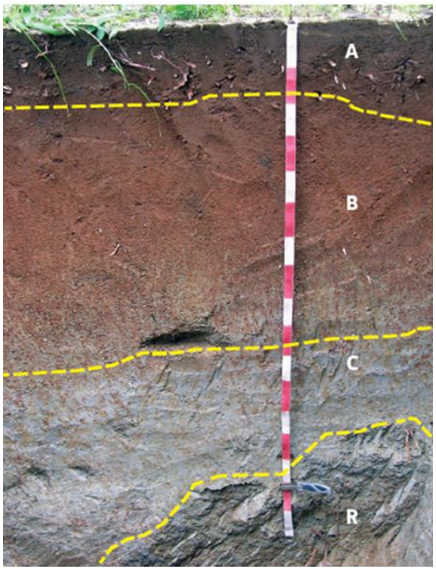


Figure 1 : organisation classique d'un sol (profil) où les principaux horizons sont bien visibles, ainsi que la roche mère (R). L'horizon A correspond à une zone riche en matière organique, l'horizon B une zone intermédiaire, l'horizon C représente la zone d'altération de la roche-mère. L'échelle est donnée à titre indicatif, le plus souvent, on représente ainsi le premier mètre de sol (d'après European Commission et al. 2016).

I.2. Eléments solides

La matrice solide est composée majoritairement de composés chimiques inorganiques (les minéraux) mais aussi de composés chimiques organiques, ces composés étant constitués de différents éléments chimiques.

Les éléments majeurs de la croûte terrestre sont ceux dont la teneur est supérieure à 1 $g.kg^{-1}$. Ce sont par exemple l'oxygène (O, 466 $g.kg^{-1}$) ou le silicium (Si, 277 $g.kg^{-1}$). Ils sont présentés par ordre d'abondance dans le tableau 1. Ils représentent plus de 99% de la composition de la croûte terrestre continentale supérieure. Les éléments mineurs, sont par définition présents à des concentrations allant de 100 à 1000 $mg.kg^{-1}$. Les éléments traces sont les éléments que l'on retrouve en quantité inférieure à 100 $mg.kg^{-1}$. Il peut s'agir de métaux (Cd, Cu, Pb, Ni), de métalloïdes ou semi-métaux (B, Se, As) et de non-métaux (F, Br ; Girard et al. 2010). Les éléments métalliques sont donc naturellement présents dans

les sols. Tous les éléments s'organisent et forment une variété de composés minéraux qui définissent des fractions minéralogiques participant aux propriétés des sols (Girard et al. 2010). Ces fractions minéralogiques sont de nature, abondance et organisation variables et peuvent, sous certaines conditions, lier des contaminants (adsorption, chélation, complexation) et participer à leur mise en réserve ou leur relargage. Les conditions physico-chimiques de la matrice "sol" régule ces équilibres (CETE Lyon 2007; Martins 2008 ; Zhang et al. 2013; Comensoli et al. 2017).

Tableau 1 : catégories et concentrations de quelques éléments, par ordre d'abondance, au sein de la croûte terrestre (tels que cités par Leleyter-Reinert 2017).

Catégorie d'élément	Symbole de l'élément	Abondance ($g.kg^{-1}$)
Eléments majeurs abondance > 1 $g.kg^{-1}$	O	466
	Si	277
	Al	81
	Fe	50
	Ca	36
	Na	28
	K	26
	Mg	21
	Ti	4
	H	2
	P	1
	Mn	1
Eléments mineurs 0,1 < abondance < 1 $g.kg^{-1}$	Ba	0,4
	La	0,4
	Cl	0,15
	Cr	0,1
Eléments traces abondance < 0,1 $g.kg^{-1}$	Ni	0,084
	Zn	0,070
	Cu	0,060
	Pb	0,010
	Th	0,010
	U	0,003
	As	0,002
	B	0,001
	Cd	< 0,010
	Se	< 0,001

I.2.1. Les minéraux

Les minéraux silicatés, comme les quartz, les feldspaths, ou les pyroxènes représentent 92% des minéraux de la croûte terrestre. Les minéraux non silicatés représentent les 8% restant et comprennent les oxydes (autres que SiO_2), les carbonates, les phosphates, les halogénures, les sulfures et les sulfates ainsi que les éléments natifs (Leleyter-Reinert 2017). Les minéraux subissent des altérations qui peuvent-être mécanique ou chimique. Les altérations mécaniques dues au vent par exemple ou à la pluie aboutissent à un fractionnement de plus en plus fin. Les altérations chimiques impliquent des réactions acido-basiques, de complexation, d'oxydoréduction et aboutissent au fractionnement et à la modification chimique des minéraux, conduisant à l'apparition de nouveaux minéraux, tels que les argiles. Toutes ces altérations participent à la pédogénèse (Girard et al. 2010 ; Leleyter-Reinert 2017).

Les argiles sont les minéraux composés par des aluminosilicates hydratés. Ils sont souvent associés à des hydroxydes de Fe ou d'Al. Ce sont des phyllosilicates dont la structure de base est en feuillets. L'espace entre chaque feuillet est nommé l'espace interfoliaire. Cet espace peut être occupé par des cations hydratés ou anhydres. Selon l'organisation des feuillets (et la nature des ions), on peut définir différentes familles d'argiles, dont les structures ont des complexités et des propriétés variables. Toutes les argiles (exemple : la kaolinite, la smectite et la vermiculite) peuvent cependant être impliquées dans les processus de rétention/relargage de contaminants métalliques. Leur surface spécifique, leur capacité de gonflement et leur charge de surface sont les principales propriétés qui régulent ces processus. La charge spécifique sera positive ou négative en fonction du pH du sol. Les charges superficielles sont alors neutralisées par des ions de charges opposées. Pour les sols, ces charges sont souvent négatives et donc neutralisées par des cations, dont les métaux (Girard et al. 2010 ; Leleyter-Reinert 2017).

Les minéraux carbonatés sont formés par l'association d'un ion carbonate (CO_3^{2-}) avec un ou plusieurs cations métalliques (ou métalloïdes). La calcite est un carbonate fréquent ($CaCO_3$), tout comme la dolomite ($[CaMg(CO_3)_2]$). Ils sont eux aussi sensibles aux variations de pH, participent au pouvoir tampon du sol et peuvent aussi adsorber et précipiter des éléments. Cu, Pb et Zn présentent une bonne affinité pour ces minéraux et forment alors : la cérusite ($PbCO_3$), la malachite ($Cu_2(OH)_2CO_3$) et

la smithsonite ($ZnCO_3$) par exemple. Les minéraux carbonatés sont très sensibles aux variations de pH (Hamdoun 2015).

Les oxydes métalliques sont présents sous forme amorphe ou cristalline. Il s'agit d'un terme générique qui regroupe les oxydes, les hydroxydes et les oxyhydroxydes de Fe, de Mn et d'Al. Les oxydes et hydroxydes de Fe sont en général les plus divers et les plus répandus. Leur structure est aussi souvent plus complexe. La goethite, (FeOOH), la ferrihydrite ($5Fe_2O_3$, $9H_2O$) et l'hématite (Fe_2O_3) sont fréquentes. Les oxydes de Fe peuvent être impliqués dans la rétention d'autres métaux en raison de la substitution possible du Fe par d'autres éléments (Al, Cr, Ni, Co par exemple). Les oxydes de Fe sont très finement divisés (quelques dizaines à centaines d'Å) et présentent une surface spécifique importante contribuant à une forte réactivité qui sera aussi conditionnée, entre autres, par le pH et le potentiel d'oxydoréduction. Par exemple, Cu s'adsorbe préférentiellement sur la goethite alors que Pb s'adsorbe préférentiellement sur l'hématite. Les oxydes de Mn sont mal définis car peu abondants et très complexes mais semblent avoir une réactivité importante (Leleyter et Probst, 1999 ; Martins 2008; Girard et al. 2010).

Les minéraux soufrés sont le plus souvent issus de la biodégradation de la matière organique par les microorganismes. Les sulfures sont impliqués dans le piégeage de cations métalliques en raison de la faible solubilité de nombreux sulfures métalliques (notamment CdS, CuS et PbS qui ont des produits de solubilité de l'ordre de 10^{-27} pour CdS, 10^{-36} pour CuS et 10^{-28} pour PbS). La précipitation de ces sulfures pourrait induire une diminution de la mobilité de ces métaux ainsi piégés (Sterflinger, 2000).

Les minéraux phosphatés sont très répandus dans les sols sous forme d'apatite, d'hydroxyapatite et de fluoroapatite. Ils sont aussi capables de fixer des cations métalliques mais les mécanismes en jeu sont moins connus et moins performants qu'avec les autres minéraux (Hamdoun, 2015).

I.2.2. La fraction organique abiotique

La matière organique des sols est liée à la biologie du sol et constitue un compartiment majeur du cycle terrestre du C (Chenu et al. 2015). La matière organique suit un cycle complexe et existe sous

différents stades. La matière organique "vivante" est liée aux organismes (et est définie au paragraphe I.4, page 28), alors que la matière organique "fraîche" est constituée par des débris végétaux, des cadavres et des excréments d'animaux. La matière organique particulaire ou dissoute correspond aux substances humiques (humus), exsudats racinaires et molécules de la dégradation et du métabolisme racinaire (polyphénols par exemple) et des produits du métabolisme microbien. Les litières des sols forestiers sont très riches (grâce à la dégradation progressive des litières entre autres par les champignons). Le temps de résidence moyen de la matière organique dans les sols est de 15 ans. Le turn-over est donc rapide (Horwath 2015). La matière organique participe aussi au recyclage des nutriments (C, N, P, K, S), à la réactivité physico-chimique des sols, à leur organisation structurelle et aux transferts de composés. Elle regroupe une très grande diversité de molécules et de macromolécules riches en groupements fonctionnels tels que types –SH, -COOH, -OH qui ont une forte affinité de complexation pour les cations. Certains constituants comme les acides fulviques peuvent donc aisément complexer les ions métalliques et influencer leurs transferts (Girard et al. 2010; Chenu et al. 2015; Parton et al. 2015). Ces interactions sont principalement régulées par le pH et le potentiel d'oxydo-reduction.

I.3. Paramètres physico-chimiques

De nombreux paramètres sont utilisés pour caractériser les sols. Nous n'évoquerons que quelques paramètres importants pour les transferts de polluants métalliques.

Le pH peut influencer de nombreuses réactions physico-chimiques (complexation, sorption) et biochimiques (réaction enzymatique). Il a donc un rôle essentiel dans les transferts de composés et de contaminants. Comme dit précédemment, les groupements chimiques portés par les différentes fractions du sol sont chargés positivement ou négativement, souvent en fonction du pH (et de leur pKa). Des composés chargés négativement seront donc en mesure de lier les cations métalliques. En fonction des affinités et des constantes de solubilité, ces liaisons ioniques seront plus ou moins fortes et les composés formés plus ou moins stables. De nombreux acides organiques sécrétés par la biosphère, notamment les champignons, sont des acides faibles et peuvent complexer les métaux, notamment s'ils sont liés à la

fraction carbonatée (Tremel-Schaub et al. 2005; INERIS 2006; Fomina and Gadd 2007; Martins 2008; Adamo et al. 2014).

Le potentiel d'oxydoréduction influence la mobilité des éléments. En effet, les propriétés des éléments (solubilité notamment) sont variables selon leur état d'oxydation. Un milieu réducteur a plutôt tendance à libérer les métaux liés aux oxydes alors qu'un milieu oxydant aura tendance à libérer les métaux liés à la matière organique (Hamdoun 2015). Tout comme le pH, le potentiel d'oxydoréduction est influencé (entre autres) par la biosphère (respiration cellulaire, sécrétion de molécules oxydantes ou réductrices).

I.4. Eléments biotiques

Les éléments biotiques des sols comprennent tous les êtres vivants des sols (et forment la matière organique vivante). On estime que 10% seulement de la biodiversité du sol est connue alors qu'elle pourrait représenter un quart de la biodiversité mondiale. Cette biodiversité est pourtant essentielle au bon fonctionnement des sols et des écosystèmes en étant un véritable moteur de nombreux cycles biogéochimiques (European Commission et al. 2016). La figure 2 montre que certains services écosystémiques de première importance comme la régulation du climat, la fertilité agronomique et les régulations hydriques sont assurés par les organismes des sols et que les champignons jouent un rôle à tous les niveaux (Ahmad and Rasool 2014; Alegria Terrazas et al. 2016; Ballhausen and de Boer 2016). Pour illustrer cette diversité, on estime qu'en France, les principaux types de sols de la métropole (prairie, forêt, culture, vigne) hébergent en moyenne 1283 taxons bactériens (ADEME 2015). La diversité fongique semble très variable selon les types et les conditions des sols. Leur biomasse est en général supérieure à celle des bactéries mais le nombre de taxons est souvent inférieur (Bills et al. 2004 ; Zak et Wildman, 2004). Peu d'études donnent des chiffres de cette diversité qu'il est parfois difficile d'appréhender en raison de la difficulté à isoler et identifier ces taxons. De nombreuses espèces ne sont pas cultivables et les études moléculaires sont loin d'être exhaustives. L'étude moléculaire de Bourceret et al. (2018) portant sur un sol contaminé par des HAP et des métaux dénombre cependant une moyenne

d'environ 5 phyla fongiques (dominés par les Ascomycètes) pour 17 phyla bactériens (dominés par les Proteobacteries). Jeffery (2010) mentionne une biodiversité fongique pouvant aller jusqu'à 1000 espèces par gramme de sol (analyse moléculaire). Dans les sols, la diversité fongique a plutôt tendance à s'enrichir avec le temps, ce qui est plus variable pour les bactéries (Bourceret et al. 2018).

Des interactions trophiques complexes participent aux cycles des éléments abiotiques dont certains sont des nutriments (Fe, K, Na, Mg, Cu par exemple) (Genre and Bonfante 2012; Kertesz and Frossard 2015; Parton et al. 2015). En raison de leur activité biochimique, les organismes du sol, en particulier les microorganismes et surtout les champignons, influencent certains paramètres notamment le pH et le potentiel d'oxydoréduction, par la sécrétion d'agents complexant, de réducteurs, d'oxydants, d'enzymes, d'acides organiques… Ils participent donc à la mobilisation et/ou l'immobilisation des éléments. (Burford et al. 2003; Martins 2008; Carré et al. 2017). Cette activité influence aussi la décomposition de la litière, le recyclage des nutriments, la structuration (organisation spatiale), qui sont aussi des tâches assumées par la biodiversité du sol, notamment par les champignons. Tous les groupes taxonomiques sont sensibles à l'anthropisation des sols (Bills et al. 2004 ; Zak et Wildman, 2004, Bourceret et al. 2018).

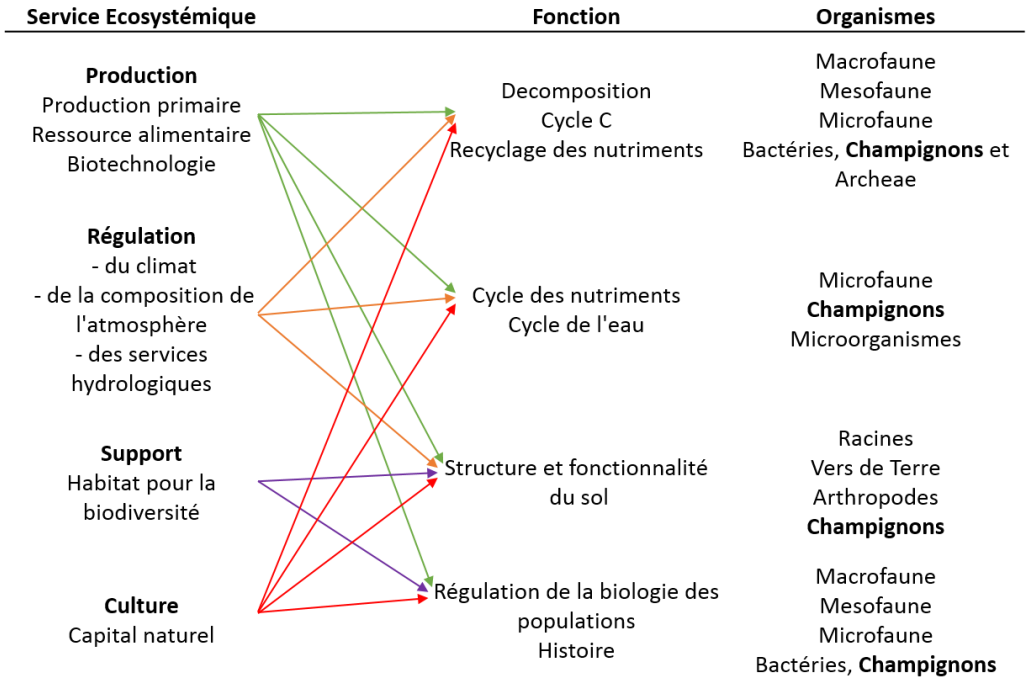


Figure 2 : relations schématiques entre services écosystémiques, fonctions et biologie des sols (European Commission et al. 2016).

I.5. Les pressions et les contaminations

Les pressions exercées sur les sols regroupent tous les facteurs qui contribuent à une baisse de qualité des sols, à sa consommation ou à sa destruction. Un sol est dit de qualité lorsqu'il est vivant, résilient, et qu'il peut rendre ses services écosystémiques. Au niveau européen, la dégradation des sols coûterait 38 milliards d'euros annuels aux pays membres (http://www.actu-environnement.com, 2011). Parmi les nombreuses pressions que subissent les sols telles que l'érosion, la salinisation, la perte en matière organique, l'artificialisation, la perte de biodiversité, etc, (figure 3), les pollutions sont importantes et liées aux activités humaines. Comme le montre la figure 3, les sources d'émissions anthropogéniques sont nombreuses et agissent à plusieurs niveaux. Par exemple, les pratiques agriculturales peuvent être des sources de pollutions qui vont potentiellement diminuer la biodiversité, engendrer une eutrophisation, et modifier les paramètres du sol, influençant aussi la mobilité des métaux (Baize et al. 2011; Montanarella et al. 2015; Paya Perez et al. 2017). La gestion de ces pressions est multifactorielle, complexe et représente un enjeu majeur de gestion durable des sols (Tremel-Schaub et al. 2005; US EPA 2013; European Commision 2015; Brevik et al. 2017; Morgan et al. 2017).

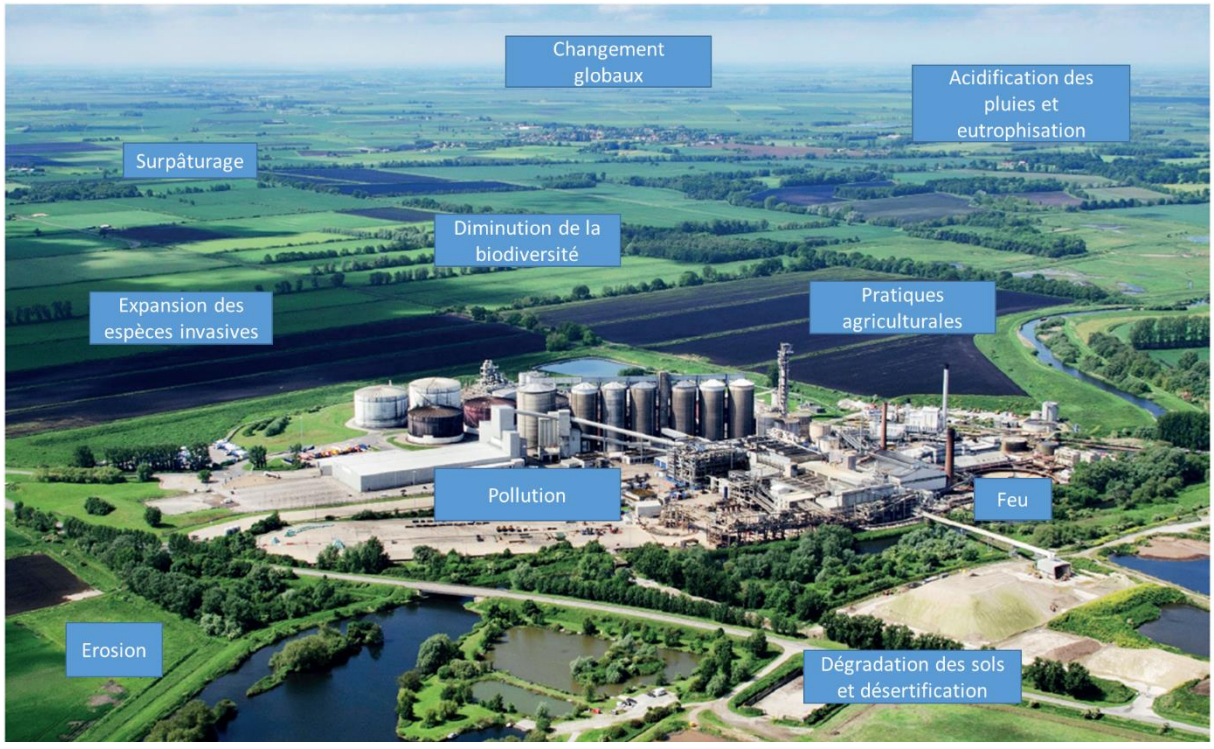


Figure 3 : exemple des nombreuses pressions subies par les sols et engendrées par les activités humaines (d'après European Commission et al. 2016).

Les contaminations regroupent de nombreuses familles chimiques réparties entre des composés organiques et inorganiques. Les polluants organiques sont des composés carbonés. Ils sont souvent produits lors de combustions incomplètes, ce qui génère une pollution d'abord atmosphérique puis des sols par dépôts des particules (Wilson et Jones 1993 ; Kadri et al 2017). Les polluants organiques comprennent les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), les PolyChloroBiphényles (PCB), les pesticides, les phtalates, les phénols et polyphénols, les PolyBromoDiphénylEther (PBDE) et les résidus médicamenteux. Leurs propriétés sont variables, certains sont cancérigènes. Ils sont souvent stables chimiquement (d'où leur persistance environnementale) mais des méthodes basées sur leur possible (bio)dégradation émergent depuis plusieurs années (Elekwachi et al. 2014 ; Speight et El Gendy 2018).

Les composés inorganiques comprennent les métaux, qui seront détaillés au chapitre suivant (page 36). On les retrouve au sein de tous les écosystèmes (sol, eau, air). (Speight 2017). Les fertilisants minéraux (phosphates, nitrates), les sulfures, les oxydes d'azote et de soufre, les perchlorates font aussi partie des composés inorganiques. Ils peuvent de plus piéger des métaux (Montanarella et al. 2015; Carré et al. 2017).

L'usage ubiquitaire de ces nombreuses familles chimiques a engendré une pollution diffuse majeure et globale au sein des écosystèmes. Des sources de contaminations ponctuelles sont aussi identifiées et nombreuses. Des solutions de substitution sont parfois mises en place afin de limiter les émissions. Cependant, la persistance des contaminations dans le temps permet la diffusion et le transfert des polluants au sein des écosystèmes. Ainsi, les concentrations retrouvées chez les super-prédateurs (dont l'Homme) montrent leur accumulation et sont le reflet de l'imprégnation de la chaine alimentaire et donc de la biosphère en général (Liu et al. 2012; Clipson and Gleeson 2012; Chamannejadian et al. 2013; Zhang et al. 2013). L'environnement dans sa globalité montre des contaminations par ces composés (Nahmani and Lavelle 2002; US EPA 2014; European Environment Agency 2015; Leleyter et al. 2016). Cette contamination touche aussi la biologie et la physico-chimie des sols (Antoniadis et al. 2017).

I.5.1. Situation mondiale

Plus de 10 millions de sites contaminés sont répertoriés à travers le monde, les métaux sont présents dans plus de la moitié d'entre eux (He et al. 2015b), comme le montre le tableau 2. Aux Etats-Unis, on compte 600 000 ha de sols contaminés par les métaux, dont 50 000 sont jugés comme nécessitant une action urgente de remédiation par l'agence de protection de l'environnement américaine (Environmental Protection Agency, EPA) (US EPA 2014; Khalid et al. 2016). Parmi les 20 substances dangereuses prioritaire énoncées par l'EPA, on retrouve 3 métaux : Pb, Cd et Hg (US EPA 2013).

En Chine, 4 millions d'ha de terres arables, presque 3% des terres arables chinoises, ont été polluées modérément ou massivement. Quelques 10 millions d'hectares (25% des terres agricoles chinoises) ont été contaminées par des métaux comme Pb, Cd, Zn, Cr, générant environ 10 millions de tonnes de pertes de récoltes par an (Khalid et al. 2016, Rodríguez-Eugenio et al. 2018).

De nombreux autres pays, tels que l'Inde, le Pakistan, le Bengladesh, le Nigeria, le Botswana, le Mali, le Kenya, l'Angola, le Ghana soulignent les risques sanitaires et environnementaux dus aux contaminations des sols, en particulier par les métaux (Montanarella et al. 2015 ; Khalid et al. 2016).

Tableau 2 : évaluation du nombre de sites contaminés dans quelques régions et pays du monde et part des sites contaminés par les métaux (d'après He et al., 2015).

Pays	Nombre de sites pollués	Pourcentage de sites pollués par les métaux
Etats-Unis d'Amérique	> 100000	> 70
Union Européenne	> 80000	37
Australie	> 50000	> 60
Chine	1 million km^2	> 80
Canada	13000	-
Pologne	> 10000	
Grèce	> 10000	
Mondial	**> 10000000**	**> 50**

I.5.2. Situation européenne

En Europe, plus de 3 millions de sites présentent des activités susceptibles de polluer les sols par les métaux. Environ 250 000 sites sont considérés comme contaminés par les métaux (Foucault et al.

2013a; Foucault et al. 2013b; European Environment Agency 2015; Stolte et al. 2015). On estime que le nombre total de sites contaminés devrait s'accroître de 50% d'ici 2025 (Carré et al. 2017)

Des terres agricoles peuvent présenter des contaminations importantes par les métaux. De nombreux pays font état de cette pollution tels que la Pologne, la Grèce, l'Italie et la France, par exemple. En Allemagne, environ 10 000 ha de terres agricoles sont trop contaminés et ne permettent plus la production alimentaire. La Commission Européenne estime que ces pollutions génèrent une perte de 17 milliards d'euros annuels (European Environment Agency 2015; Montanarella et al. 2015; Stolte et al. 2015; Tóth et al. 2016; Khalid et al. 2016; Paya Perez et al. 2017).

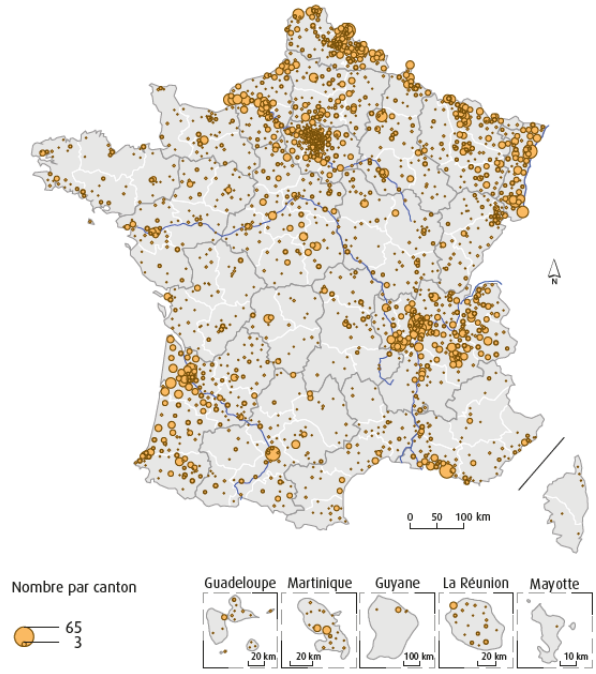
I.5.3. Situation française

Deux bases de données nationales sont gérées par le ministère de l'environnement et ont pour mission de recenser les sites pollués en France. La base de données BASIAS (http://www.brgm.fr/site-web/basias) recense, en janvier 2018, 257 000 "sites et anciens sites industriels et à activité de service susceptible d'être ou d'avoir été à l'origine d'une contamination". La base de données BASOL sur les "sites et sols pollués ou potentiellement pollués appelant une action des pouvoirs publics, à titre préventif ou curatif" (http://basol.developpement-durable.gouv.fr/) mentionne 6715 sites contaminés en France au 28 février 2018, dont 3700 disposent d'une surveillance (l'absence de surveillance étant justifiée pour 1594 sites). Le tableau 3 montre que Cd concerne 2,3% des sites (n=154) ; Cu 4,9% (n=331) et Pb concerne 6,6% des sites (n=443). Pb, Cr (5,1%, n=342) et Cu sont les 3 métaux les plus fréquents. En comparaison, l'ensemble des hydrocarbures concernent 13% des sites (877) et les HAP concernent 6,4% des sites (429). Ces données montrent l'importance du nombre des sites contaminés en général et contaminés par les métaux en particulier. La répartition géographique de ces sites est illustrée par la figure 4. Les régions les plus impactées sont aussi les régions au passé industriel le plus conséquent (Nord et Est de la France en particulier).

Tableau 3 : nombre de sites concernés par des pollutions métalliques, des hydrocarbures ou des HAP d'après les données de BASOL.

Elément (ou famille chimique)	Nombre de sites
Cd	154
Cu	331
Pb	443
Cr	342
Métaux	2270
Hydrocarbures	877
HAP	429

De plus, toujours selon BASOL, la moitié des 6715 sites a un impact avéré sur l'environnement et potentiellement sur la santé. Parmi les impacts avérés, 52 sites ont requis l'arrêt du captage de l'eau, plus de 3000 sites avaient des concentrations en polluants dans les eaux souterraines supérieures aux normes. De plus, 29 sites ont généré des concentrations anormales dans les végétaux à destination des populations. Baize et al. (2011) ont publié un rapport sous l'égide du GISSol (Groupement d'Intérêt Scientifique pour les Sols) sur l'état des ressources « sols » de France. Les auteurs mentionnent l'importance des contaminations, notamment par les métaux, dont Cd, Cu et Pb. Foti et al. (2017) font le lien entre gradient de contamination et urbanisation, illustrant l'importance des flux d'origine anthropique pour ces contaminations.



Note : base de données Basol portant sur les sites faisant l'objet d'actions de surveillance ou de réhabilitation.

Source : Medde/DGPR, Basol au 5 mars 2015. Traitements : SOeS, 2015

Figure 4 : principaux sites pollués en France recensés en 2015. Cette carte montre la concentration de ces sites en lien avec l'histoire industrielle du territoire métropolitain (ADEME 2015).

II. Eléments traces métalliques

II.1. Définition et liens avec le sol

Comme évoqué au paragraphe I.2 (page 23), les métaux sont des constituants naturels des sols, issus de la roche-mère sous-jacente. Ils existent sous différentes formes chimiques, états d'oxydation, associés à diverses molécules ou fractions minéralogiques. Les métaux peuvent être adsorbés (espaces interfoliaires et surfaces des argiles par exemple), former des précipités, se substituer à des ions dans les minéraux ou former des complexes avec différents composés organiques ou inorganiques. L'évolution des paramètres de la matrice peut modifier cette répartition (Das et al. 2014; Leleyter-Reinert 2017). L'ensemble de ces transferts (aussi régulés par le pH et le potentiel d'oxydoreduction) forment un cycle biogéochimique (figure 5) dont les sols (et la biosphère) sont des compartiments. Ces derniers jouent donc aussi un rôle dans ces transferts et leurs régulations. Tous les métaux peuvent s'accumuler dans les différents compartiments, dont les sols et les organismes, si un apport est maintenu (Amiard 2011).

Certains métaux sont nécessaires à la vie des sols. Ils ont un rôle de cofacteur enzymatique le plus souvent, comme par exemple Cu. Ces oligo-éléments, ou éléments essentiels, peuvent malgré tout devenir toxiques s'ils sont présents en trop grande quantité (Matute et al. 2011). D'autres n'ont aucun rôle biologique connu, c'est le cas de Cd et de Pb. Ces derniers seront donc toxiques (pour la biosphère) même à très faibles doses (Tremel-Schaub et al. 2005). De plus, les métaux ne sont pas, ou très peu, métabolisés (Bert 2013; European Environment Agency 2015).

Le lien entre la contamination des sols par les métaux et leurs transferts vers les populations est avérée. Ces pollutions sont donc aussi des enjeux de santé publique au niveau mondial, comme le souligne plusieurs études et rapports récents (Lucas et al. 2012; Montanarella et al. 2015; He et al. 2015b; Khalid et al. 2016 ; Rodríguez-Eugenio et al. 2018).

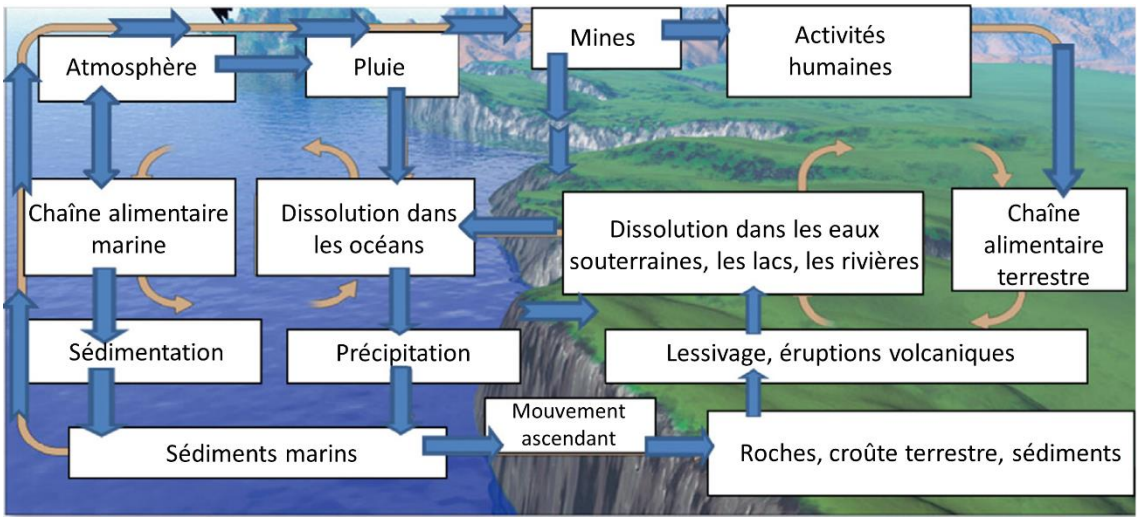


Figure 5 : schéma du cycle général des métaux dans l'environnement (d'après Das, 2014).

Dans les sols, les métaux traces forment une contamination complexe en raison de leurs propriétés physico-chimiques variées et variables en fonction des propriétés de la matrice dans laquelle ils se trouvent. Cela implique que la teneur totale en métal d'un sol est à distinguer de la fraction disponible environnementalement (figure 6). La teneur totale comprend aussi des formes non mobiles, car fortement liées à leurs matrices, donc à risque toxique plus faible, voire absent. Seules les fractions (bio)disponibles présentent un danger potentiel. (Bolan et al. 2014; Kertesz and Frossard 2015). Un métal biodisponible est un métal qui peut être biosorbé par un organisme. La biosorption suit généralement 2 étapes : l'adsorption, puis l'absorption proprement dite. L'adsorption est la liaison d'un composé sur une surface, ici une surface biologique, le plus souvent une membrane ou une paroi cellulaire (cette liaison peut aussi avoir lieu entre un métal et des surfaces non biologiques, comme celles des minéraux argileux par exemple). Cette adsorption est régie par un équilibre thermodynamique. Il s'agit d'une liaison réversible. Du point de vue biologique, l'adsorption est le plus souvent une étape préalable à l'absorption qui correspond cette fois au passage à travers les membranes biologiques pour faire passer les composés à l'intérieur de la cellule ou de l'organisme. Ce sont aussi des transferts soumis à des équilibres thermodynamiques. Ces transferts peuvent être passifs (diffusion simple) ou actif (utilisation de transporteurs nécessitant de l'énergie et qui sont plus ou moins spécifiques) (Gube 2016).

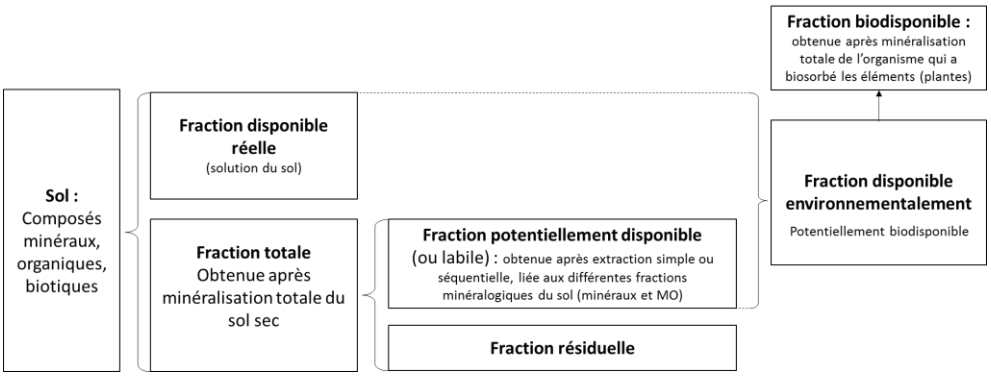


Figure 6 : représentation schématique des fractions totales, résiduelles, potentiellement disponibles et biodisponibles d'un sol.

Une même concentration totale d'un métal donné n'aura donc pas les mêmes conséquences en fonction du type de sol (selon la zone géographique considérée) qui va définir les fractions minéralogiques auxquelles sera lié le métal, et donc définir des transferts et la disponibilité du métal. Il est ainsi difficile de définir des concentrations seuils permettant de différencier une pollution d'une anomalie géomorphologique. Le tableau 4 donne cependant des exemples de valeurs (en France métropolitaine) pour le Cd, Cu et Pb basées sur l'analyse de plusieurs milliers d'échantillons.

Tableau 4 : exemple de valeurs de référence pour interpréter les concentrations en métaux dans les sols en France métropolitaine (Mench and Baize 2004; Baize et al. 2007).

Métal	Gamme courante ($mg.kg^{-1}$)	Anomalie ($mg.kg^{-1}$)	Anomalie forte ($mg.kg^{-1}$)
Cd	0,05 - 0,45	0,7 - 2,0	2,0 - 46,3
Cu	2,0 - 20,0	20,0 - 62,0	65,0 - 160,0
Pb	9,0 - 50,0	60,0 - 90,0	100 - 10180
Cr	10 - 90	90 - 150	150 - 3180
Ni	2 - 60	60 - 130	130 - 2076
Zn	10 - 100	100 - 250	250 - 3800

Une anomalie forte devra être caractérisée plus précisément afin de quantifier la proportion potentiellement disponible de métal et d'évaluer le risque représenté. Cette caractérisation détaillée a pour but de distinguer une anomalie naturelle, due à une roche mère exceptionnellement riche, d'une

contamination d'origine humaine. Mench and Baize (2004) recommandent un seuil d'investigation pour des concentrations dans les sols supérieurs à 0,7 ; 35 et 60 $mg.kg^{-1}$ respectivement pour Cd, Cu et Pb.

Les émissions totale de métaux liées aux activités humaines seraient d'une à trois fois supérieures aux émissions naturelles (Amiard 2011). Ces émissions excédentaires entraînent un apport massif et continu qui surcharge les compartiments des cycles biogéochimiques. D'après Bellec et al. (2015), et comme le montre la figure 7, « les effluents d'élevage seraient responsables de plus de 50% des apports de Cu, Zn, As, Mo, Hg, Ni. Les engrais minéraux de plus de 40% des apports de Cr, Cd, Se. Boues et compost d'origine urbaine ne dépasseraient pas 20 % des apports en métaux » (Bellec et al. 2015). Ces apports sont globalement sous des formes plus mobiles que les formes issues de la pédogénèse et se stockent préférentiellement dans les fractions réellement et potentiellement disponibles des sols.

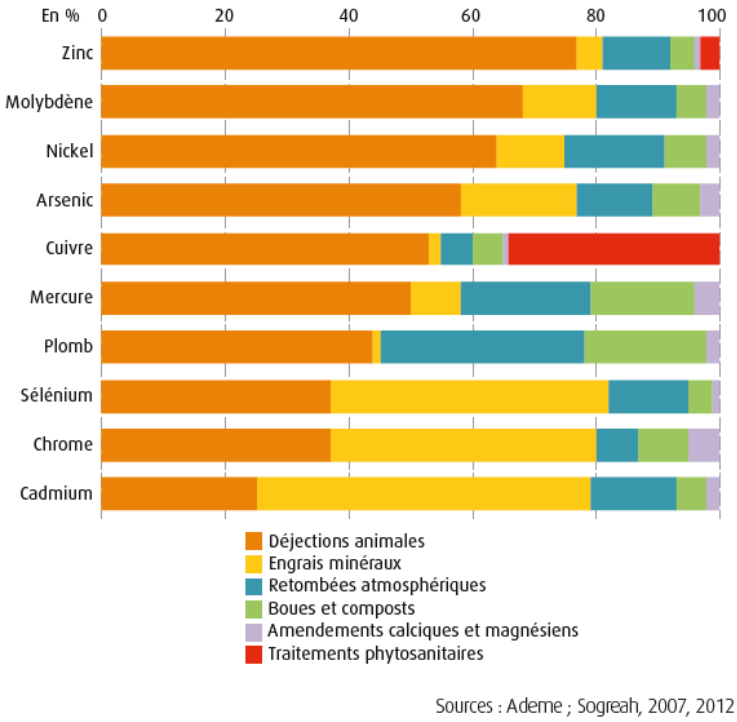


Figure 7 : part, en pourcentage, des différents apports de métaux et métalloïdes aux sols agricoles.

Au regard de leur potentiel toxique et de leur présence ubiquitaire, nous avons choisi de concentrer notre travail sur 3 métaux : Cd, Cu et Pb. Ces 3 métaux sont en effet des contaminants majeurs

devenus des problèmes de santé publique en raison du risque de transfert vers les populations, les ressources alimentaires et hydriques (Bellec et al. 2015). L'ingestion d'aliments contaminés ou de particules de sols (notamment chez les enfants) représente la principale voie d'exposition chez l'Homme. L'inhalation et le contact cutané peuvent aussi être des voies significatives (Tremel-Schaub et al. 2005; Lucas et al. 2012).

II.2. Cadmium (Cd)

Le cadmium (Cd) fait partie des substances dangereuses prioritaires de la directive cadre sur l'eau (2455/2001/CE). C'est un élément mineur de la croûte terrestre, non essentiel et toxique à faible dose. Il est aussi cancérigène (Bisson and Houeix 2014).

II.2.1. Sources, usages et émissions

Le Cd n'existe pas naturellement à l'état natif mais sous sa forme d'oxydation (+II). Il est souvent associé à Zn, Cu et Pb dans la croûte terrestre au sein de laquelle il est naturellement présent. C'est pourquoi il est souvent un sous-produit de l'exploitation de minerais riches en ces métaux. Dans les sols, Cd se combine facilement avec le soufre (S) minéral et organique, les carbonates, les phosphates. Les éruptions volcaniques constituent la principale source d'émissions naturelles. Les autres émissions sont majoritairement liées aux activités humaines. Les roches sédimentaires sont en générales plus riches en Cd que les roches volcaniques (Smolders et Mertens 2013).

Quelques 21 000 tonnes de Cd sont produites annuellement au niveau mondial. Il est utilisé dans la fabrication d'accumulateurs électriques, la photographie, la métallisation des surfaces. C'est aussi un agent stabilisant pour les plastiques (Dumat et Austruy 2014). La combustion du charbon et des produits pétroliers, les incinérateurs, et la métallurgie forment les principales sources de rejets atmosphériques. Dans l'eau, le Cd provient du lessivage des sols, des décharges et du traitement des effluents industriels et miniers. Son usage est de plus en plus limité, voire interdit. Mais en raison de sa persistance dans

l'environnement, des apports diffus et de la difficulté de le substituer dans certaines applications, les rejets sont encore importants (ADEME et INERIS 2017). On le retrouve parmi les épandages de boues de stations d'épuration et comme contamination fréquente des engrais phosphatés largement utilisés en agriculture (Smolders et Mertens 2013).

II.2.2. Transferts et potentiel toxique

Les formes Cd^{2+}, $CdSO_4^-$, $CdCl^+$, $CdHCO_3^+$, CdO, $CdCO_3$, $Cd(PO_4)_2$, CdS, $CdCl_2$ représentent les principales formes chimiques du Cd dans les sols (Dumat and Austruy 2014).

Le Cd a tendance à s'accumuler dans les horizons supérieurs, plus riches en matière organique pour laquelle il possède une bonne affinité. Le Cd d'origine anthropique est plus mobile dans les sols que le Cd d'origine pédologique (Tremel-Schaub et al. 2005). De manière générale, Cd a plutôt tendance à se lier aux oxydes et à la matières organique (Smolders et Mertens 2013). La fraction carbonatée peut aussi être importante (Adriano 1986). Le pH est le principal facteur modifiant la mobilité du Cd. La concentration dans la solution du sol augmente pour des pH inférieurs à 6, ce qui traduit à pH acide une mobilisation du Cd et l'augmentation de sa (bio)disponibilité (Bisson and Houeix 2014). Des pH faiblement acides favorisent la formation de chélates avec les acides fulviques[4] des sols. Au contraire, des pH basiques (>8) ont plutôt tendance à favoriser la liaison de Cd avec les carbonates. Les ions Ca^{2+}, Zn^{2+} et H^+ peuvent facilement entrer en compétition dans les phénomènes de transferts de Cd (Adriano 1986). Dans les eaux, le Cd est sous forme relativement mobile (cations hydratés, complexes avec les composés de la matière organiques entre autres) (INERIS 2006; Martins 2008).

[4] Les acides fulviques constituent une part importante des humus qui résultent de la biodégradation, (principalement par les animaux, les bactéries et les champignons) et de transformations chimiques donnant de nouvelles molécules complexes. Il s'agit d'un constituant important des matières organiques (Parton et al. 2015; Voroney and Heck 2015).

Cet élément peut être très biodisponible pour les plantes. La laitue, le chou et l'épinard l'accumulent dans les parties consommées (Tremel-Schaub et al. 2005). L'alimentation fournit environ 28 à 38 % de la dose journalière tolérable. La législation européenne autorise un maximum de 0,2 $mg.kg^{-1}$ sur les récoltes (Règlement CE n° 466/2001 – 8 Mars 2001). La concentration maximum légale dans l'eau de boisson est 0,005 ppm (Tremel-Schaub et al. 2005).

La figure 8 montre que les teneurs moyennes dans les horizons supérieurs des sols de la métropole ssont le plus souvent inférieurs à 0,5 $mg.kg^{-1}$, notamment en Normandie. Plusieurs études sur des sols normands ont trouvé des valeurs légèrement supérieures. Ainsi, Saussaye (2012), trouve des valeurs de 0,5 à 2 $mg.kg^{-1}$. Baraud et Leleyter (2012) trouvent des valeurs allant de 2 à 5 $mg.kg^{-1}$, selon les échantillons, la valeur la plus forte étant lié à une zone contaminée par une industrie métallurgique. Il existe donc des variations locales qui peuvent être importantes et qui sont liées au contexte d'usage des sols (pouvant induire une contamination) et au contexte pédologique. Ces valeurs montrent que, comparé au tableau 4, le contexte normand peut localement présenter des anomalies en ce qui concerne les teneurs en Cd. Certaines anomalies sont mesurées en dehors de tout contexte de contamination.

L'étude de Jean et al. (2018) montre que la dose hebdomadaire tolérable de Cd (calculée en fonction du risque d'apparition d'une néphrotoxicité) est dépassée pour une proportion importante de la population des enfants de moins de 3 ans ainsi que pour 15% des jeunes de 3 à 17 ans. Cependant, l'étude montre aussi que les adultes (>18 ans) accumulent plus le Cd que les jeunes. Des symptômes peuvent apparaître entre 40 et 50 ans après exposition et accumulation au cours de la vie. Les toxicités endocriniennes et neurotoxiques de Cd sont aussi mises en exergue par cette étude. L'exposition ne devrait pas dépasser 2,5 $\mu g.kg.sem^{-1}$ pour rester en dessous du seuil urinaire de 1 $\mu g.g^{-1}$ de créatinine (cette exposition correspond à la dose tolérable hebdomadaire, estimée par modélisation (ANSES 2017). Dans ce but, un projet de loi européenne vise à diminuer les teneurs légales en Cd des engrais phosphatés qui sont la première cause d'exposition des populations non fumeuses (90%), via les transferts vers les récoltes. Ainsi, cette teneur légale passerait de 60 à 20 $mg.kg^{-1}$ d'ici 2026 (Parlement Européen 2017). Cd peut se substituer au Zn et au Ca dans les processus biologiques, ce qui peut expliquer une partie de sa toxicité. Il peut aussi interférer dans le métabolisme du Fe. L'ingestion a montré une augmentation

d'incidence des leucémies, des cancers des testicules et des lésions prolifératives de la prostate chez le rat. Le Cd est aussi génotoxique et tératogène (Bernhoft 2013; Gwaltney-Brant 2013; Das et al. 2014; Bisson and Houeix 2014).

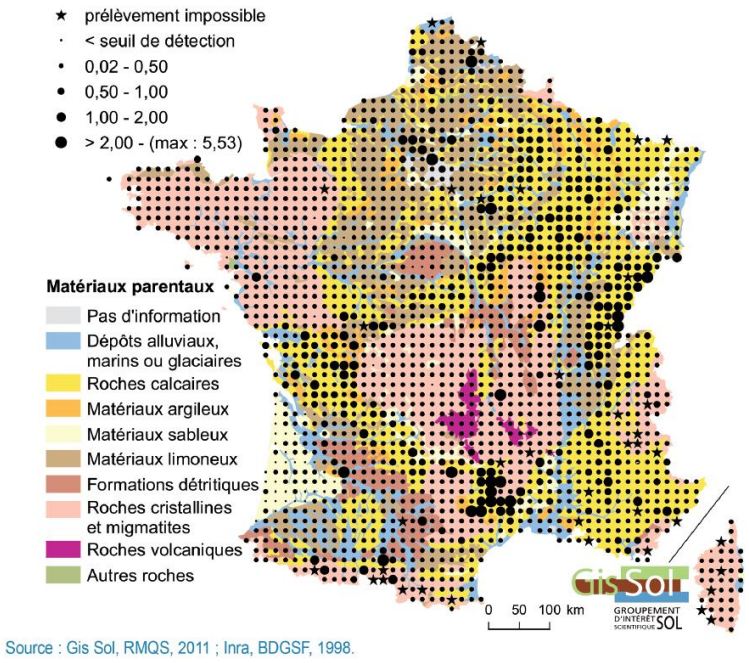


Figure 8 : teneur en Cd (mg.kg^{-1}) dans la partie superficielle des sols en France métropoliataine.

II.3. Cuivre (Cu)

Le cuivre est un oligo-élément essentiel et semble être peu toxique pour l'être humain. Son accumulation environnementale peut en revanche avoir des répercussions sur les fonctionnements des écosystèmes : modification de la structure des communautés microbiennes, stress végétaux, perturbations métaboliques, baisse de rendements (Lejon et al. 2008; Bernard et al. 2009; Zhang et al. 2013). Le Cu est un antifongique historique et efficace, toujours largement employé de nos jours (Vincent et al. 2017). C'est, avec Pb, un des premiers métaux utilisés par l'espèce humaine.

II.3.1. Sources, usages et émissions

Le cuivre existe à l'état natif, sous forme de sulfure et sous forme d'oxyde. Les formes chimiques prédominantes sont le cation divalent Cu^{2+} et le carbonate de cuivre $CuCO_3$. Cu est ubiquitaire dans l'environnement (Amiard 2011). Les poussières transportées par le vent, les décompositions végétales, les éruptions volcaniques, les feux de forêts et les aérosols marins constituent les principales sources naturelles d'exposition.

Le cuivre est l'un des métaux les plus utilisés en raison notamment de ses conductibilités thermiques et électriques. Les 16 millions de tonnes produites chaque année dans le monde (Dumat and Austruy, 2014) sont retrouvées dans la production de matériel électrique (fils, transformateurs, bobines, …), la plomberie, l'automobile, la chaudronnerie. Il est aussi très utilisé pour former des alliages : bronze (avec l'étain), laiton (zinc), constantan (nickel). Des alliages avec l'or et l'argent sont aussi utilisés en joaillerie. Le cuivre est aussi utilisé comme catalyseur dans la fabrication du caoutchouc, il sert de pigment pour la céramique, d'antifongique et d'insecticide. Le chlorure de cuivre est utilisé comme catalyseur dans l'industrie pétrolière, comme désodorisant, désulfurant ou purifiant, mordant pour la teinture et pour l'impression de textiles. Les sources de dissémination comprennent les industries pré-citées, auxquelles il faut ajouter celles du bois, de l'incinération des ordures ménagères, de la combustion de charbon, d'huile et d'essence, et enfin la fabrication de fertilisants phosphatés (Pichard and Bisson, 2005). Il est à noter que l'utilisation importante de bouillie bordelaise est une source importante de pollution des sols agricoles (d'où une contamination importante des régions viticoles, figure 9). L'utilisation du Cu a augmenté de 300% en 50 ans (INERIS 2006).

II.3.2. Transferts et potentiel toxique

La grande majorité du cuivre libérée par les activités anthropiques va vers le sol (97%) et seulement 3% vers les eaux (Amiard, 2011). Le cuivre rejeté dans l'eau est majoritairement particulaire et tend à se déposer, à précipiter, ou à s'adsorber à la matière organique, au fer, aux oxydes de Mn, aux argiles. Dans les sols, il se trouve aux états d'oxydation (+I) ou (+II) et son temps de résidence peut être

très long (plusieurs milliers d'années). La figure 9 illustre les concentrations en Cu dans les horizons superficiels du territoire métropolitain et montre que le territoire normand ne présente pas de contexte pédologique particulier avec une moyenne entre 20 et 50 $mg.kg^{-1}$. Plusieurs études sur des sols normands ont trouvé des valeurs similaires, voire inférieures. Ainsi, Saussaye (2012), trouve des valeurs de 5 à 10 $mg.kg^{-1}$ et Baraud et Leleyter (2012) trouvent des valeurs allant de 12 à 35 $mg.kg^{-1}$ selon les échantillons. Il existe donc là aussi des variations locales qui peuvent être importantes. Les valeurs mentionnées par ces études sont compatibles avec la gamme courante de Cu présentée dans le tableau 4, sauf la plus forte valeur de Cu (35 $mg.kg^{-1}$) qui est liée à un contexte de pollution.

Dans les sols et les sédiments, Cu est majoritairement lié aux oxydes (Fe et Mn) et à la matière organique. Les carbonates et les sulfures peuvent aussi le lier de manière importante sous certaines conditions (abondance en carbonates notamment) (Adriano 1986). Le pH, le potentiel redox, la capacité d'échange cationique et la teneur en matière organique sont les principaux facteurs influençant la mobilité du cuivre. Cu est soluble et mobile pour des pH inférieurs à 5 (forme Cu^{2+} majoritaire) mais pratiquement plus mobile au-delà de pH 7. Cu possède une forte affinité pour la matière organique, avec laquelle il forme des complexes solubles (avec les acides fulviques) ou insolubles (avec les acides humiques). Cette affinité a pour conséquence de concentrer Cu dans les premiers centimètres du sol (Oorts 2013). Il est donc peu susceptible de pénétrer dans les sols en profondeur mais reste sensible au drainage et au ruissellement.

Il s'accumule dans les racines des plantes en fonction du pH qui régule son absorption. Zn, Ca et K peuvent être des compétiteurs pour son absorption. Cu adsorbé sur la matière organique n'est pas disponible pour les végétaux terrestres. Le chaulage ou un apport de matière organique peuvent fortement diminuer le transfert vers les plantes (Mench et Baize 2004). Dans les sols, Cu peut moduler la diversité microbienne et ainsi influencer le cycle du C en favorisant l'émission de CO_2 et en diminuant l'incorporation de C dans les sols (Lejon et al. 2008; Bernard et al. 2009).

La ration quotidienne des français est de 1,48 $mg.j^{-1}$, principalement apportée par l'alimentation, alors que les apports nutritionnels conseillés sont de 2,5 $mg.j^{-1}$. Les fruits, légumes et céréales apportent environ 54% de cette ration (et les boissons environ 10 %) (Girard et al. 2010; Amiard 2011). Cu est un

oligo-élément nécessaire entre autres à la synthèse de l'hémoglobine. Sa carence entraîne une anémie hypochrome microcytaire. La toxicité due à la carence est plus fréquente que l'intoxication par excès. Sa toxicité aiguë est rare et concerne le plus souvent l'eau de boisson. Elle se caractérise principalement par des troubles digestifs importants dus à l'action irritante des composés cuivrés et des vomissements qui interviennent tôt dans l'intoxication, ce qui permet d'éliminer le toxique ingéré. L'empoisonnement aigü est rarement grave. Une intoxication chronique peut provoquer des perturbations psychologiques du type insomnies, pouvant aller jusqu'à la schizophrénie en raison des propriétés stimulantes pour le système nerveux (Pichard and Bisson 2003). Des intoxications chroniques peuvent être rencontrées chez des utilisateurs réguliers de bouillies bordelaise exposés aux inhalations de vapeurs. On retrouve alors principalement un syndrome pulmonaire, des lésions hépatiques (fibroses, cirrhoses, hypertension portale) et une incidence accrue d'adénocarcinomes (Tremel-Schaub et al. 2005; Pichard and Bisson 2005; Bes et al. 2013; Ballou and Wilson 2016).

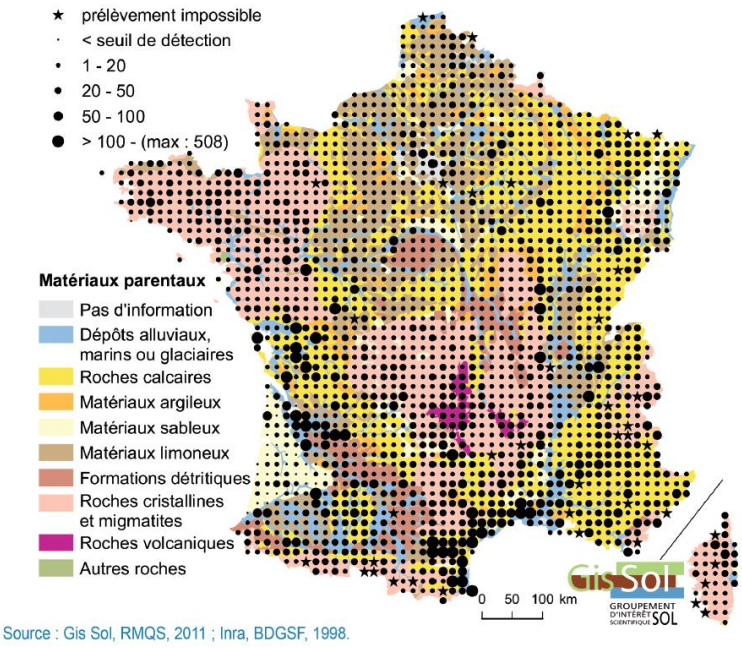


Figure 9 : teneur en Cu dans la partie superficielle des sols en France métropoliataine.

II.4. Plomb (Pb)

Pb fait partie des substances dangereuses prioritaires de la directive cadre sur l'eau (2455/2001/CE). C'est un élément mineur de la croûte terrestre ; il est non essentiel. C'est cependant un des métaux les plus abondants dans la nature et l'un des premiers métaux exploités par l'Homme.

II.4.1. Sources, usages et émissions

Pb est présent dans la croûte terrestre et dans tous les compartiments de la biosphère. Les rejets atmosphériques issus des fumées volcaniques sont peu importants. Dans l'environnent, Pb est principalement à l'état d'oxydation +II. Le sulfure de Pb, ou galène (PbS), est la principale forme existante et exploitée pour la production de Pb qui atteint annuellement 4 millions de tonnes au niveau mondial (Dumat and Austruy 2014). Les rejets industriels et routiers sont les principales sources d'émissions atmosphériques. La disparition de l'essence plombée dans les années 1990 a fortement diminué la pollution atmosphérique par Pb (en France, elle a été divisée par un facteur 20 depuis cette date) (Lucas et al. 2012). L'industrie des batteries automobiles devient la principale source d'émissions et de contaminations. En effet, la substitution du Pb ne semble pas possible dans cet usage qui concentre 60% de l'utilisation du Pb en Europe. Les autres usages industriels concernent la fabrication de radiateurs automobiles, de munitions, d'alliages, d'enrobage. Ses usages concernent aussi la soudure, la céramique, le lestage mais tous deviennent minoritaires et/ou en déclin quant à l'utilisation du Pb. La dispersion des plombs de chasse constitue cependant une source de contamination importante. Pb fait partie des substances à surveiller en priorité pour préserver la qualité des récoltes, l'ingestion d'aliments contaminés étant une voie importante d'intoxication. Les plantes sont contaminées par dépôt de poussières ou par le sol. Pb peut contaminer les effluents épandus en agriculture (Amiard 2011 ; Steinnes 2013 ; Sirot 2018).

II.4.2. Transferts et potentiel toxique

Le Pb atmosphérique se déposant sur le sol reste dans les horizons superficiels (Pichard and Bisson 2003) en raison de son affinité pour la matière organique (Steinnes 2013). Pb peut aussi former des sulfures et s'adsorber sur des oxydes de Fe et de Mn pour lesquels il a une bonne affinité. Lors de la lixiviation du sol, le sulfure de Pb s'oxyde lentement, puis peut par la suite former des oxydes et des carbonates de Pb (cérusite, $PbCO_3$), souvent mélangés à des oxydes de Fe et de Mn. Pour des pH >7, le Pb peut précipiter sous des formes organiques qui sont assez stables. Le Pb peut aussi exister sous forme de sulfate (anglésite, $PbSO_4$) et de phosphate ($Pb(PO_4)_2$ par exemple). Les formes chimiques présentes dans les sols sont donc nombreuses : Pb^{2+}, $PbHCO_3^+$, $PbOH^+$, PbS, $Pb(OH)_2$, $PbSO_4$, $PbCO_3$, PbO, $Pb(PO_4)_2$, $PbO(PO_4)_2$, $PbCl^+$. Pb peut aussi former des chélates d'acides fulviques (Laperche 2004).

La figure 10 illustre les teneurs en Pb dans les horizons superficiels du territoire métropolitain. Cette carte montre que la vallée du Rhône, région industrielle et d'important trafic routier semble la zone la plus concentrée en Pb. Le quart nord-est, en raison de son passé industriel, présente aussi des concentrations fortes. La Normandie, en revanche, ne montre pas un contexte pédologique particulièrement riche en Pb, les teneurs moyennes sont inférieures à 30 $mg.kg^{-1}$. Plusieurs études sur des sols normands ont trouvé des valeurs légèrement supérieures. Ainsi, Saussaye (2012), trouve des valeurs de 5 à 40 $mg.kg^{-1}$ et Baraud et Leleyter (2012) trouvent des valeurs allant de 16 à 58 $mg.kg^{-1}$ selon les échantillons. Il existe aussi pour Pb des variations locales qui peuvent être importantes. Ces valeurs sont cependant compatibles avec les valeurs de la gamme courante citées dans le tableau 4.

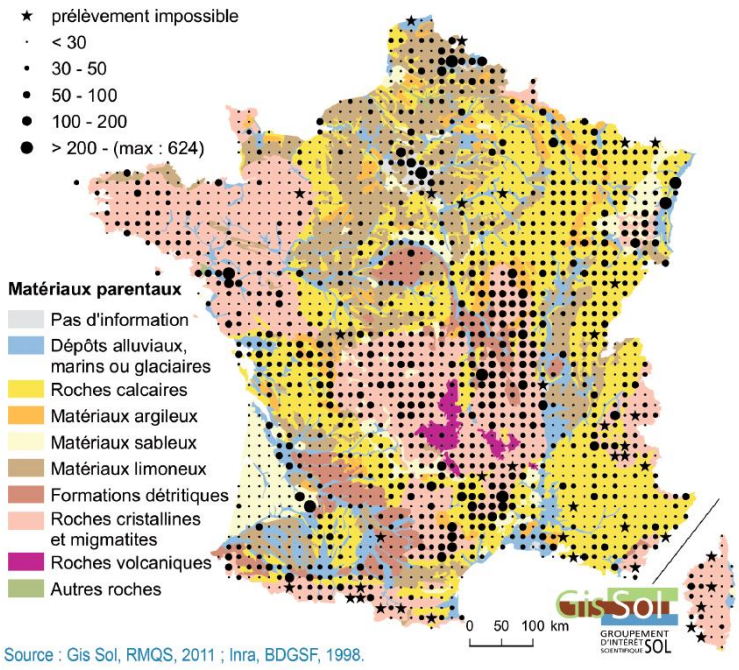


Figure 10 : teneur en Pb dans la partie superficielle des sols en France métropolitaine.

Pb est en général peu mobile dans les sols car lié à la matière organique des sols, aux oxydes de Fe et de Mn. La plupart des composés inorganiques du Pb sont peu solubles dans l'eau. Le pH et la teneur en matière organique du sol sont les principaux facteurs qui régissent sa mobilité. Une baisse de pH favorise sa migration, notamment vers la réserve en eau et donc les végétaux.

Les plantes prélèvent difficilement Pb par les racines (absorption passive) mais il peut néanmoins s'y accumuler dans des vacuoles. Les légumes feuilles accumulent particulièrement Pb : choux, épinard, salades, poireau (Tremel-Schaub et al. 2005 ; Sirot et al. 2018). L'eau de boisson peut aussi être une source d'intoxication (cas des canalisations en Pb) (Pichard and Bisson 2003; Lucas et al. 2012; Foti et al. 2017). L'alimentation couvre 34 à 57% de la DHT et les légumes sont la première source d'exposition pour les enfants (Sirot et al. 2018). La législation européenne autorise des teneurs inférieures à 0,3 $mg.kg^{-1}$ sur les récoltes (Règlement CE n° 466/2001 – 8 Mars 2001). La concentration maximale légale est de 0,01 ppm dans l'eau de boisson (Tremel-Schaub et al. 2005; Bernhoft 2013; Gwaltney-Brant 2013; Das et al. 2014).

Le plomb n'est pas un oligo-élément essentiel pour l'Homme ; aucune fonction biologique ne lui est connue. Il est toxique même à faible dose et peut être responsable du saturnisme. En intoxication

aigue, le syndrome gastro-intestinal est violent puis suivi de troubles nerveux telles qu'agitation, nervosité, convulsions, faiblesse musculaire. Cette intoxication est plutôt rare, et fait suite à une absorption par voie digestive ou par inhalation. L'administration rapide d'un traitement rend ces symptômes réversibles. L'intoxication chronique et/ou sévère conduit au saturnisme. Ce syndrome fait suite à une phase d'imprégnation, pendant laquelle la symptomatologie est frustre avant l'apparition de troubles neurologiques (confusion, anxiété, troubles de la mémoire, asthénie (Pichard and Bisson 2003).

Lanphear et al. (2018) ont publié une méta-analyse portant sur une de cohorte de 18825 adultes de plus de 20 ans. L'étude montre que les plombémies faibles (inférieures à 5 $\mu g.L^{-1}$, seuil d'investigation clinique) étaient corrélées à un risque accru de maladies cardio-vasculaires et à une surmortalité cardiovasculaire. L'étude estime que 400 000 morts par an sont imputables, au moins en partie, à l'exposition au Pb. Les auteurs concluent que le risque dû à l'exposition au Pb est largement sous-estimé et que sa rémanence environnementale et sa toxicité sont encore plus à prendre en compte malgré une mobilité apparemment faible. Nous pouvons ajouter que cette mobilité est probablement sous-évaluée, comme le montre l'étude de Baraud et Leleyter (2012) qui compare plusieurs méthodes d'extraction. Cette étude permet de conclure que la méthode d'extraction à l'EDTA, très souvent employée, sous-évalue de beaucoup la fraction potentiellement disponible de Pb par rapport à d'autres méthodes plus chronophages (extraction séquentielle en particulier). Ces méthodes sont expliquées dans le paragraphe III, page 51.

III. Techniques d'étude des métaux dans les sols

Le nombre parfois important d'espèce chimique d'un même élément ainsi que la réactivité différente de ces espèces suggèrent que les concentrations totales des éléments ne sont pas suffisantes pour caractériser le risque lié à la présence des métaux dans les sols. Les teneurs totales ne sont jamais prédictives de la mobilité, des transferts, de la biodisponibilité, des impacts sur les fonctions du sol, des toxicités. Ainsi, l'étude de la répartition minéralogique des métaux et particulièrement la fraction potentiellement disponible est une des méthodes permettant de mieux appréhender les conséquences de leur présence dans les sols. Les teneurs totales sont néanmoins informatives par rapport à la situation générale et permette de mettre en évidence des anomalies, de définir des seuils d'investigation, de calculer des facteurs d'enrichissement afin d'orienter vers l'origine anthropique ou géologique des anomalies mesurées.

III.1. Minéralisation totales ou pseudo-totales

Les plus courantes sont la minéralisation à l'acide fluorhydrique, la minéralisation à l'eau régale et la fusion alcaline. Il s'agit de méthodes destructives. La minéralisation permet la solubilisation de la matrice solide et la mise en solution de la totalité des éléments. L'analyse chimique des solutions permet ensuite de mesurer les concentrations en éléments.

Une minéralisation avec l'acide fluorhydrique (HF) permet une solubilisation totale alors qu'une minéralisation à l'eau régale ne permet qu'une solubilisation pseudo-totale (environ 95-98% du total). Cette dernière est cependant satisfaisante (pour les éléments autres que Si et Al) et la plus utilisée car moins dangereuse d'un point de vue opérationnel (risque accru avec HF). Ces minéralisations se font en milieu acide et peuvent être réalisées sur banc de sable, ou être assistées par micro-ondes. D'autres méthodes en milieu acide existent (méthode tri-acide, avec H_2O_2 par exemple).

La fusion alcaline utilise un fondant, souvent le tétraborate de lithium, ajouté à l'échantillon sous forme de poudre. La minéralisation se fait donc en milieu basique. La solution obtenue est reprise en milieu acide. Cette méthode est bien adaptée au dosage de Si, Al (Hamdoun 2015).

III.2. Extractions simples

Les extractions simples se font en une seule étape. La plupart des méthodes a pour objectif principal de quantifier directement la fraction potentiellement disponible des éléments. Les extractions simples utilisent 3 types principaux de réactifs :

- les sels, comme par exemple $CaCl_2$ ou $Ca(NO_3)_2$. Ils permettent de lessiver les cations sorbés sur les charges permanentes des éléments solides et parfois aussi sur la matière organique.

- les acides dilués, le plus utilisé étant HCl. La baisse du pH favorise la dissolution des complexes, permettant ainsi de libérer les ions métalliques. Les ions Cl^- s'ajoutent à l'effet de la dissolution acide et permettent de chélater les métaux.

- les agents complexants (ou réducteurs), comme par exemple l'EDTA, qui est un chélatant fort. Ce dernier est capable de complexer la plupart des métaux des sols (Hamdoun 2015 ; Baraud et Leleyter. 2012).

L'extraction des métaux par l'EDTA, ou HCl dilué, donnent parfois des estimations peu représentatives de la réalité des spéciations minéralogiques des éléments et surestime ou sous-estime selon les cas les quantités potentiellement disponibles. Par exemple, selon Lelyter et al. (2012), HCl a tendance à sous-estimer la fraction potentiellement mobile de Pb en raison de la faible solubilité de $PbCl_2$ (dans l'eau ou les acides dilués) qui précipite.

III.3. Extractions séquentielles

Les extractions séquentielles appliquent différents réactifs (extractants), afin de solubiliser les différentes fractions minéralogiques d'un même échantillon. De nombreuses méthodes existent. Elles se font en plusieurs étapes et sont plus longues que les extractions simples. Elles apportent cependant plus d'informations (Leleyter and Baraud 2005; Leleyter et al. 2012; Baraud et al. 2017). En fonction de sa sélectivité, chaque extractant permet d'extraire les métaux liés à une fraction minéralogique précise. L'ensemble permet de représenter la distribution des métaux dans les fractions minéralogiques correspondantes de la matrice. La diversité des méthodes et des réactifs doit cependant conduire à la prudence lors de la comparaison de résultats obtenus par des protocoles différents.

La procédure de Tessier (1979) a été très utilisée et souvent modifiée. La procédure originale prévoit d'extraire les métaux selon 5 fractions (échangeable, liée aux carbonates, liée aux oxydes de Fe et de Mn, liée à la matière organique, fraction résiduelle). Les modifications ont cherché à améliorer la sélectivité et l'efficacité des réactifs pour chaque fraction minéralogique.

La méthode BCR est une méthode de référence qui a été développée dans le but d'harmoniser les pratiques et de permettre des comparaisons et des interprétations plus reproductibles. Cette méthode s'appuie sur la méthode publiée par Tessier en 1979. Elle n'est cependant pas la plus précise, ni la plus efficace, puisqu'elle ne comporte que 3 étapes et ne définit donc que 3 fractions minéralogiques : acido-soluble, réductible et oxydable (Ure et al. 1993 ; Quevauviller et al. 1998 ; Sutherland 2010).

Le protocole de Leleyter et Probst (1999) a été confronté à d'autres protocoles d'extraction séquentielles ou simples concernant sa sélectivité et son efficacité (Leleyter et al. 2012; Baraud and Leleyter 2012; Hamdoun et al. 2015a; Leleyter 2017). Des analyses du réseau silicatés et des essais sur des composés purs (carbonates, oxydes, matière organique, minéraux argileux), entre autres, ont montré expérimentalement la pertinence dans le choix des différents solvants quant à leur sélectivité et leur efficacité (Leleyter and Probst 1999). Ce protocole propose d'extraire successivement les métaux liés à 5 fractions différentes dont l'ensemble représente la fraction potentiellement mobile des métaux. Ces fractions sont les suivantes :

- F1 : la fraction hydrosoluble, la plus mobile.
- F2 : la fraction facilement échangeable.
- F3 : la fraction acidosoluble.
- F4 : la fraction réductible. Cette fraction se décline en 3 sous-fractions (F4a, F4b et F4c) qui sont détaillées ci-après.
- F5 : la fraction liée à la matière organique.

La fraction soluble à l'eau (F1) est le plus souvent négligeable pour les sols et les sédiments. En effet, cette fraction étant lessivable par l'eau, elle l'a déjà été le plus souvent au sein de l'environnement, avant même que le prélèvement soit effectué. Cette étape est cependant nécessaire pour lessiver les colloïdes et assurer la sélectivité de l'étape suivante (Leleyter 1999).

Le lessivage des cations échangeables (F2) est effectué par $Mg(NO_3)$. Le cation divalent Mg^{2+} s'échange avec les cations emprisonnés dans les lacunes ou les espaces interfoliaires des argiles. Ce sel est efficace, sélectif et n'a aucun impact sur les carbonates, les oxydes de Mn, les oxydes de Fe ainsi que le réseau silicaté des argiles (Leleyter-Reinert 2017).

Le lessivage de la fraction acidosoluble, ou fraction liée aux carbonates (F3), est réalisée par un mélange d'acétate de sodium et d'acide acétique. Le pH est fixé à 4,5. Ce pH permet de complètement solubiliser la calcite (et partiellement la dolomite et les phosphates de Ca). En revanche les oxydes et minéraux argileux ne sont pas altérés (Leleyter-Reinert 2017).

La fraction réductible (F4) comprend les ions liés aux oxydes de Mn et de Fe. Ces oxydes sont très souvent des piégeurs de contaminations métalliques dans les sols. Le lessivage de la fraction réductible est subdivisé en 3 sous fractions (F4a à F4c). Le chlorure d'hydroxylammonium est considéré comme l'extractant le plus spécifique des oxydes de Mn (F4a). En effet, il réduit les oxydes Mn^{4+} insolubles en Mn^{2+} très solubles et mobiles. Les oxydes de Fe ont un potentiel d'oxydoréduction plus faibles et ne sont pas minéralisés par ce solvant. Il n'existe pas de solvant spécifique pour solubiliser les oxydes de Fe. Selon Leleyter-Reinert (2017), il est possible de pousser les conditions d'extraction de l'étape précédente pour les rendre plus agressives et extraire les métaux liés aux oxydes de Fe,

cependant, cette méthode a une efficacité relative et manque de sélectivité (le réseau silicaté est aussi attaqué). Une alternative consiste à utiliser un acide, ou un ligand chélatant, ou un réducteur. Le protocole utilisé ici combine ces 3 actions en 2 étapes. Sont utilisés l'acide oxalique (pour ses propriétés acides) et l'oxalate d'ammonium (chélatant) pour la première étape (F4b). La seconde étape utilise l'acide ascorbique (réducteur) en plus des deux premiers réactifs (F4c). Cette méthode permet une bonne sélectivité (le réseau silicaté n'est pas attaqué) ainsi qu'une bonne efficacité.

La matière organique et les sulfures stockent aussi les éléments traces métalliques (F5). Des conditions oxydantes et/ou acides permettent de les solubiliser. L'eau oxygénée (H_2O_2) permet de minéraliser plus de 75% de la MO. Les liaisons retenant les métaux étant les premières à être détruites, nous pouvons considérer une extraction efficace des métaux liés à cette fraction par ce réactif (Leleyter-Reinert 2017).

III.4. Dosage des éléments par ICP-OES

L'analyse chimique élémentaire des minéralisats/extraits permet ensuite de connaître précisément leurs teneurs en éléments métalliques. La spectrométrie atomique d'émission est très largement utilisée dans ce type d'étude. En effet, la plupart des éléments du tableau périodique peuvent être dosés lors d'un seul passage de l'échantillon dans l'appareil. Un plasma d'argon (Ar) est généré par chauffage d'un flux continu de gaz. La mesure de l'intensité des photons émis par les éléments lors du passage d'un état excité à un état fondamental permet de déterminer la quantité de chaque élément grâce à un étalonnage externe.

III.5. Etudes des impacts environnementaux

Pour compléter ces analyses, des méthodes écotoxicologiques sont utilisées afin de caractériser l'exposition aux toxiques et d'associer un niveau de risque à des concentrations en métal. Elles utilisent des tests biologiques et des indicateurs qui permettent d'évaluer l'exposition d'organismes sentinelles

(lombriciens, plantes, algues, crustacés ou microorganismes) à un ou des toxiques et de caractériser le risque lié à cette exposition. Elle peuvent aussi permettre de mesurer la fraction biodisponible réelle d'un toxique pour un être vivant (Vasseur et al. 2008; Foucault et al. 2013a; Dumat and Austruy 2014; Jean et al. 2015). Des indices spécifiques des métaux ont été développés comme par exemple l'indice PhytoMet qui évalue la biodisponibilité des métaux par les plantes (Bert 2013). De nombreux tests existent. La norme NF ISO 11269-1 – 2013 relative à la mesure de la qualité des sols décrit notamment un test d'inhibition de la croissance des racines des végétaux. Ce test permet de mettre en évidence la toxicité d'un sol, exprimée comme l'inhibition de la croissance des racines des végétaux (souvent l'orge) par rapport aux végétaux qui ont poussé sur un sol témoin calibré exempt des toxiques éventuels.

IV. Remédiation des sols contaminés et intérêt du monde fongique

IV.1. Introduction

Comme évoqué dans les paragraphes précédents, la contamination par les métaux devient globale et sa gestion représente un enjeu de santé publique et de développement durable. De plus en plus de méthodes de remédiation se développent pour lutter contre les effets néfastes des pollutions environnementales qui affectent le fonctionnement des écosystèmes. Ces méthodes sont classiquement organisées selon leur nature physico-chimique ou biologique, et selon leur mise en œuvre *in situ,* sur site (traitement des terres excavées) ou hors site. Concernant les métaux, 3 méthodes physico-chimiques (isolation, vitrification, immobilisation chimique) et une méthode biologique (phytoremédiation) sont les plus employées actuellement (Laperche 2004; Colombano 2010; ADEME 2014; ADEME 2015). Les méthodes électrocinétiques connaissent aussi un fort développement (Habibul et al. 2016).

IV.2. Techniques biologiques

L'EPA définit la bioremédiation comme l'usage d'organismes vivants, principalement des microorganismes non dangereux, pour nettoyer les sols, l'eau ou les eaux usées, des pollutions qu'ils

contiennent. Les méthodes biologiques sont affectées par les paramètres environnementaux tels que le pH, le potentiel d'oxydoréduction, l'humidité, la nature des organismes présents et l'accessibilité aux polluants. La biodégradation par les organismes vivants est une approche permettant la dégradation des composés en utilisant les capacités enzymatiques des bactéries, champignons, algues ou plantes. Les biodégradations ne sont évidemment possibles que pour des composés métabolisables, ce qui est rarement le cas des métaux. Les méthodes biologiques vont dans ce cas favoriser la bioséquestration (ou la bioaccumulation) des métaux au sein d'organismes tolérants (principalement des plantes, des bactéries ou des champignons), ou leurs transformations en composés stables, afin de diminuer leur biodisponibilité. Cette biostabilisation met en jeu les processus de détoxication du vivant. L'objectif des remédiations de pollutions métalliques sera alors de maîtriser le risque toxique en gérant les transferts de polluants. Les phytotechnologies peuvent aussi favoriser l'utilisation de plantes hyperaccumulatrices dans le but d'extraire les métaux après récolte des végétaux (Bert 2013). Les champignons présentent un fort potentiel dans ces domaines de la bioremédiation (Fomina et Gadd 2017 ; Ceci et al. 2051 ; Gadd 2016 ; Gadd 2017 ; Albert et al. 2018).

Même si les méthodes biologiques sont moins développées sur le terrain que les méthodes physico-chimiques, leur potentiel, révélé par des tests en laboratoire ou des études pilotes sur le terrain, est important (Roudier 2004; Bert 2013; Roy-Gleizes 2016). Leurs principaux atouts sont les suivants :

- elles respectent la biologie du sol et sont moins "agressives" que les méthodes physico-chimiques (qui utilisent souvent des solvants ou des tensio-actifs qui peuvent avoir un impact fort sur la matrice physico-chimique et/ou la biologie des sols) (Khalid et al. 2016). Elles peuvent permettre une refonctionnalisation des sols (due aux activités rhizosphériques notamment) et une valorisation potentielle (paysagère et de la biomasse) (Dumat et Austruy 2014 ; Bert 2013).
- elles ne génèrent pas, ou moins de pollutions secondaires liées à l'utilisation de réactifs (RoyChowdhury et al. 2018 ; Khalid et al. 2016.
- elles sont moins onéreuses que les méthodes physico-chimiques (RoyChowdhury et al. 2018, Khalid et al. 2016 ; Bert 2013).

- elles sont principalement des méthodes *in situ* et sur site, permettant de mieux maîtriser les coûts de traitement (car elles ne nécessitent pas d'excavation du sol, principal facteur de surcoût des techniques qui le nécessitent) (Khalid et al. 2016 ; Bert 2013.
- elles peuvent être utilisées en complément d'autres techniques physico-chimiques (Khalid et al. 2016, Dumat et Austruy 2014).

Le principal inconvénient est une durée de traitement plus longue comparativement aux autres techniques (Bert 2013 ; Khalid et al. 2016).

En bioremédiation, plusieurs approches sont envisageables :

- L'atténuation naturelle (ou bio atténuation) consiste simplement à suivre l'évolution des contaminations prises en charge par la biodiversité native d'un site (Bernheim 1999 ; Roudier 2004).

- La biostimulation apporte des nutriments pour favoriser le métabolisme des microorganismes déjà présents (microflore autochtone).

- La bioaugmentation supplémente la matrice en microorganismes allochtones sélectionnés afin d'améliorer et compléter les capacités endogènes de bioremédiation (Bernheim 1999; Roudier 2004).

Il faut cependant veiller à ne pas produire de sous-produits plus toxiques. Les voies métaboliques doivent donc être maîtrisées. De plus, les espèces indigènes apportées doivent pouvoir se développer dans une matrice où la compétition biologique pour les ressources peut être rude, sans pour autant perturber le fonctionnement normal de cette matrice (Gouma et al. 2014).

De nombreuses techniques existent : le compostage, le landfarming, les biopiles, le bioventing, ou encore l'utilisation de bioréacteurs (Bernheim 1999; Roudier 2004). Ces procédés peuvent-être réalisés *in situ*, sur site ou *ex situ* (Bernheim 1999; Roudier 2004).

IV.3. Intérêts des champignons en bioremédiation

IV.3.1. Particularités et diversité du monde fongique

Les champignons, en raison de leur grande capacité d'adaptation, ont pu coloniser tous les environnements (terrestres et aquatiques). Ce groupe très ancien (des fossiles âgés de 800 à 900 millions d'années ont été retrouvés) font partie des Opisthokontes, parmi les Eucaryotes. Ils sont hétérotrophes au carbone et se nourrissent par absorption. Leur membrane plasmique contient de l'ergostérol. Ils possèdent une paroi cellulaire, constituée de microfibrilles d'un polymère, la chitine (Lecointre and Le Guyader 2009; Garon and Guéguen 2015). Ces êtres vivants jouent de nombreux rôles écosystémiques. Ils sont par exemple les acteurs nécessaires à la réalisation de cycles biogéochimiques de nombreux éléments chimiques et nutriments (recyclage et décomposition de la matière organique, cycle du C et de N) (Genre and Bonfante 2012; Audet 2014). Les champignons sont à la fois des êtres vivants pionniers dans la colonisation des biosphères et des espèces ingénieures des sols. Ils participent à leur formation et à leur entretien (cohésion des agrégats de sols, sécrétions diverses), ainsi qu'à la mise en place des écosystèmes (Dighton 2003 ; Deacon 2010 ; Ballhausen et de Boer 2016).

Les champignons filamenteux sont constitués par des hyphes, véritables explorateurs du milieu dans lequel ils se développent. Les hyphes ont un diamètre de quelques microns et croissent par extension de leur paroi sur une extrémité apicale. Cette croissance apicale confère une grande longueur associée à un petit diamètre et donne aux hyphes une grande surface par rapport au volume qu'ils occupent. Cette caractéristique permet aux champignons d'optimiser l'absorption des nutriments et, de manière plus générale, d'avoir une très grande réactivité avec leur environnement. Chaque hyphe peut croître individuellement ou en se regroupant, formant alors un réseau, le mycélium, qui facilite et accélère le transport de nutriments, ce qui permet de croître et d'explorer des zones pauvres en nutriments où la croissance serait lente ou non permise (Lee Taylor and Sinsabaugh 2015). Le mycélium peut aussi former des rhizomorphes qui sont plus larges et plus résistants. Ils sont mis en place pour le transport de l'eau et des nutriments sur de longues distances, ou à travers de zones non favorables. La zone apicale de croissance est une zone d'intense activité métabolique, comparé au reste du mycélium.

Les champignons ont une croissance radiale, centrifuge sur ou dans leur substrat. Ce dense réseau cellulaire qu'est le mycélium forme la partie végétative des champignons. La classification actuelle répartit les champignons dans 5 phylums :

- les Chytridiomycètes (*Chytridiomycota*) qui sont présents en milieu aquatique,
- les Zygomycètes (*Zygomycota*) : il s'agit d'un embranchement d'espèces caractérisées par la présence d'un mycélium cœnocytique (non cloisonné),
- les Ascomycètes (*Ascomycota*) : il s'agit d'un vaste embranchement d'espèces produisant des spores (ascospores) regroupées dans des asques,
- les Basidiomycètes (*Basidiomycota*) : il s'agit d'un embranchement d'espèces produisant des spores (basidiospores) portées par des basides,
- les Gloméromycètes (*Glomeromycota*) qui interagissent avec les racines des plantes (mycorhizes).

Trois phylums sont représentés au sein de nos travaux : les Zygomycètes, les Ascomycètes et les Basidiomycètes.

Les **Zygomycètes** sont caractérisés par un mycélium coenocytique. En effet, il n'y a pas de cloison cellulaire entre les hyphes. La reproduction sexuée (fusion de deux gamétocystes) forme une zygospore. La reproduction asexuée forme des sporocystes, chacun contenant de nombreuses sporocystospores. La plupart des espèces sont saprotrophes. Leur croissance est rapide et on les retrouve dans la plupart des matrices (sols, aliments, matériaux divers). Ce groupe est très ubiquiste.

Les **Ascomycètes** regroupent environ 75% des espèces de champignons actuellement décrites. C'est un important phylum dont la reproduction sexuée est caractérisée par les asques. Ces cellules spécialisées contiennent des ascospores formées par la fusion de deux noyaux haploïdes compatibles. Une méiose suit cette fusion, les 4 ascospores retrouvent donc l'haploïdie, puis une mitose permet de former 8 ascospores. Le mode de reproduction le plus courant consiste en la production de spores par simple mitose, il s'agit de la reproduction asexuée. Certaines espèces ne sont connues que par cette reproduction asexuée (stade anamorphe, à distinguer du stade téléomorphe issu de la reproduction

sexuée). Les Ascomycètes forment un groupe monophylétique, ils dérivent tous d'un même ancêtre commun. Leur mycélium est septé : les hyphes sont séparés entre elles par une membrane percée d'un pore central afin d'assurer les échanges intercellulaires (déplacement des nutriments). C'est un groupe d'importance économique : de nombreuses biotechnologies utilisent des levures, des *Penicillium* ou des *Aspergillus* pour la production de molécules d'intérêt (antibiotiques, antifongiques) mais aussi pour la production alimentaire (pain, bière, fromage) (Botton and Larpent 1990). La plupart des Ascomycètes sont saprotrophes. Leur morphologie est très variée. Des genres tels que *Chaetomium, Fusarium, Xylaria, Hypoxylon, Sordaria* sont fréquents dans les sols et sont capables de dégrader la cellulose (Watkinson et al. 2016). Certains Ascomycètes forment aussi des symbioses avec les plantes (genre *Tuber*, les truffes) ou avec des cyanobactéries (formant alors des lichens). Enfin, certains Ascomycètes peuvent être pathogènes pour les végétaux (fusariose par exemple) ou les animaux (infections opportunistes le plus souvent).

Les **Basidiomycètes** comptent 30 000 espèces actuellement décrites. Il s'agit là aussi d'un groupe monophylétique. Les modes de vie sont aussi variés et l'importance écologique et économique sont importantes également. La plupart des champignons forestiers (les macromycètes) récoltés ou cultivés à des fins culinaires (par exemple *Agaricus* spp, *Pleurotus* spp) appartiennent à ce groupe. Certains taxons contiennent des phytopathogènes de récoltes et de plantes sauvages (*Puccina graminis* infectant le blé *Triticum* spp, *Armillaria* spp parasitant les arbres) et des espèces toxiques voire mortelles pour l'Homme (*Amanita phalloides* par exemple). Les hyphes sont cloisonnés et les tissus fongiques de ce groupe sont caractérisés par le dicaryon, résultat de la plasmogamie. Deux hyphes compatibles fusionnent, ainsi, deux noyaux haploïdes partagent un cytoplasme. Le mycélium dicaryotique caractérise le cycle de vie de ces champignons. En effet, le mycélium peut rester à l'état dicaryotique très longtemps. C'est sa forme de développement végétatif qui permet la mise en place de grands réseaux mycéliens. La caryogamie (fusion des deux noyaux) permettra le développement des basidiospores afin de répéter le cycle. Certains Basidiomycètes sont capables de dégrader des polymères complexes naturels tels que la lignine (*Phanerochaete chrysosporium*) et la cellulose (*Serpula lacrymans*) ou les deux (*Donkioporia expansa*). Les Basidiomycètes sont eux aussi trouvés dans de très nombreuses

matrices (litière, compost, cadavres d'animaux, surface des feuilles des plantes, troncs d'arbres, …). Nombreux sont saprotrophes ou mycorhiziens (*Amanita* spp, *Boletus edulis*, *Lactarius* spp, ...) (Watkinson et al. 2016).

Dans les sols, les champignons sont les organismes les plus représentés en termes de biomasse et d'activité microbienne, particulièrement dans les sols forestiers. Les rôles et services écosystémiques les plus connus des champignons concernent la décomposition de la matière organique et le recyclage des nutriments (saprotrophes) ainsi que leur influence sur la structure et les propriétés du sol, *via* leurs filaments et leurs sécrétions. De très nombreux phyla sont présents dans les sols. Au sein des Basidiomycètes, les Agaricales comportent des genres souvent forestiers, tels que *Agaricus, Amanita, Pleurotus*. Les Bolétales sont aussi souvent représentées, ainsi que les Polyporales et les Russulales. Chez les Ascomycètes, les Sordariales (genres *Sordaria, Chaetomium*) sont très fréquentes. Les genres *Penicillium, Aspergillus* et *Fusarium* sont aussi majeurs dans les sols, ainsi que les genres *Acremonium, Alternaria, Chrysosporium* et *Trichoderma*. Les genres *Mucor, Absidia*, et *Rhizopus* sont les principaux représentants des Zygomycètes des sols (Domsch 1980; Bills et al. 2004; Garon and Guéguen 2015). D'après Bourceret et al. (2018), les sols sont en général plutôt dominés par les populations de Basidiomycètes mais les sols pollués semblent plutôt dominés par les Ascomycètes.

IV.3.2. Métabolisme fongique

Les champignons constituent un groupe très diversifié. Chaque niche écologique peut en effet abriter de nombreuses espèces. Ce groupe représente donc un réservoir de gènes et d'activités métaboliques potentiellement intéressantes (Singh 2006; Fomina and Gadd 2007; Dixit et al. 2015; Singh 2015). Le métabolisme fongique permet la décomposition de la matière organique, la dégradation de molécules complexes en nutriments bioaccessibles. Cela favorise les cycles des éléments organiques et inorganiques tels que C, H, O, N, P, S, Na, Mg, Ca, K. Ce métabolisme participe aussi aux cycles des métaux, métalloïdes et radionucléides naturels ou de source anthropogénique. Les champignons minéralisent les nutriments d'abord pour leur propre développement. Cependant, les mécanismes

d’absorption ne sont pas totalement efficaces et une partie est ainsi rendue disponible pour le reste de la biosphère, notamment les plantes et la continuité des cycles biogéochimiques (Genre and Bonfante 2012; Kertesz and Frossard 2015; Marmeisse and Girlanda 2016). Les champignons sont en général les premiers à coloniser un milieu pauvre du fait de leur résistance, adaptabilité et mode de nutrition. Mais en rendant les nutriments biodisponibles, ils permettent à d’autres espèces de coloniser à leur tour ce milieu qui va s’enrichir en matière organique et nutriments (Dighton 2003 ; Deacon 2010).

Peu d’espèces sont suffisamment équipées pour dégrader entièrement des molécules résistantes comme la lignine par exemple. Cependant, une colonisation successive par des espèces fongiques (cortège fongique) permet sa dégradation complète. Ainsi, des espèces dites « à sucre » vont se développer en premier et utiliser les ressources carbonées directement assimilables. Ces espèces ont nécessairement un développement rapide dû à la faible persistance de la ressource. Elles développent une stratégie rudérale (genres *Mucor, Rhizopus*). Des espèces dites compétitives vont ensuite coloniser le substrat. Ces espèces sont un peu plus spécialisées dans la dégradation et vont mieux résister aux stress éventuels. Enfin, des espèces très spécialisées vont se développer. Ces espèces sont en général capables de dégrader la cellulose et/ou la chitine. Ce dernier groupe comprend beaucoup d’Ascomycètes et de Basidiomycètes. Cette succession d’espèces est associée à des modifications du milieu et à la mobilisation des nutriments (Baldrian 2003; Baldrian 2006).

IV.4. Potentiel pour la bioremédiation des métaux

L'acidification provoquée par le métabolisme fongique peut conduire à la désorption et la solubilisation des métaux liés aux différentes fractions minéralogiques des sols, qui deviennent ainsi plus disponibles pour les réactions de sorption avec les champignons (Gadd 2004). Ainsi, les groupements chimiques (-COOH, -SH, -OH, $-NH_2$, $-PO_4H_2$, par exemple) des membranes biologiques (membrane cellulaire et surtout paroi fongique qui est la première en contact avec le milieu extérieur) peuvent interagir avec les ions métalliques et favoriser leur sorption. Cette interaction peut être suivie par l'absorption des métaux par les champignons. Cette biosorption peut induire des phénomènes de

détoxication ou permettre l'expression de la toxicité des métaux vis-à-vis des champignons en fonction des espèces chimiques en jeu et des doses (Fomina and Gadd 2007; Alegria Terrazas et al. 2016). Il existe aussi de nombreux ligands non spécifiques au niveau de la membrane et de la paroi fongique qui peuvent lier les métaux ; ce sont les mucopolysaccharides, la mélanine, les hydrophobines (pour les champignons filamenteux), ou la glomaline (sécrétée par les champignons mycorhiziens) (Gube et al. 2016). La grande surface des champignons engendre un nombre de site de fixation potentiel important pour les ions dont les métaux.

Les molécules d'acquisition des minéraux sont souvent mises en jeu, via la sécrétion de sidérophores et d'acides organiques notamment. Les sidérophores sont des ligands de faibles poids moléculaires sécrétés pour l'acquisition du Fe. Plusieurs types sont décrits en fonction des structures chimiques ; par exemple fusarinines, coprogènes, ferrichromes (Renshaw 2002). Les acides organiques (acide oxalique, acide citrique par exemple) sont liés au métabolisme des polymères, notamment à la dégradation de la lignocellulose[5], mais aussi à l'acquisition des minéraux. Ils sont aussi parmi les principaux responsables de l'acidification de la matrice dans la laquelle se développent les champignons et ont donc potentiellement un rôle dans la régulation des transferts des métaux. Sidérophores et acide oxalique peuvent aussi complexer les métaux libérés de leur matrice minérale (Deacon 2006). D'autres composés plus spécifiques, comme les métallothionéines (protéines riches en groupements –SH lié au métabolisme de Zn) peuvent aussi être sollicitées (Jaeckel et al. 2005). Par exemple, Cd induit la synthèse et la sécrétion d'acide oxalique et de thiols chez *Phanerochaete chrysosporium* qui peuvent complexer les ions métalliques et les empêcher ainsi d'atteindre des cibles qui induirait une toxicité (Chen et al. 2015b; Li et al. 2017). Des mécanismes similaires ont été décrits avec les sidérophores et les métallothionéines (sécrétion dans le milieu, complexation des ions métalliques). Le potentiel rédox peut aussi être mis en jeu. Ainsi, les étapes d'acquisition de Fe comprennent la liaison du sidérophore au

[5] La lignocellulose est un polymère principalement composée de cellulose, hémicellulose et lignine. On la retrouve principalement dans les parois des cellules végétales et dans la composition du bois (Baldrian et al. 2005).

Fe(III), puis la réduction de ce dernier en Fe(II) avant son absorption, ou après (selon les espèces et le statut nutritionnel) (Crichton 2019). Ces stratégies sont d'abord mises en jeu pour l'acquisition des nutriments mais aussi pour se défendre contre des substances toxiques, notamment du fait de la faible sélectivité de ces ligands qui peuvent donc lier de nombreux ions (Cd, Cu, Pb, Zn par exemple). Lors de la nutrition minérale, le complexe de l'élément est réabsorbé. Si le complexe est formé avec un élément toxique, son absorption peut engendrer entre autres, un stress oxydant qui sera alors pris en charge par les mécanismes courants (antioxydants, glutathion, polyphosphates, séquestration dans des vacuoles ou efflux). L'expression de l'enzyme super-oxyde dismutase, élément majeur de ces mécanismes, est par exemple induite suite à une exposition à Cd ou Pb (Fomina 2005, Finlay et al., 2008).

De manière générale, les métaux toxiques réduisent la croissance fongique en perturbant la physiologie du mycélium (Fomina and Gadd 2007; Lebrun et al. 2011). Ces perturbations apparaissent au-delà d'une concentration seuil. Par exemple, la présence de Cd conduit *Schizophyllum commune* à émettre des filaments aériens et à développer plus de connectivités entre les filaments. Certains champignons modifient leur pigmentation sous l'influence de métaux (Baldrian 2003). Le rôle biologique de certains métaux a été mentionné au paragraphe précédent (oligoélément cofacteur enzymatique par exemple). Cependant, d'autres métaux peuvent inhiber ces mêmes activités enzymatiques (oxydations des protéines en se liant à des acides aminés par exemple avec perturbation des sites actifs enzymatiques). Les cellulases et hémicellulases sont en général inhibées par les métaux, comme le sont de nombreuses enzymes intracellulaires (dont les groupements chimiques peuvent néanmoins servir de ligands pour les métaux). Les étapes de transcription et de traduction peuvent aussi être touchées. Ainsi, Cu peut promouvoir la synthèse de laccase (dont il est aussi un cofacteur) chez des souches de *Trametes versicolor* et augmenter leur activité chez *Pleurotus ostreatus* (comme Cd). Cependant, il peut aussi inhiber la croissance fongique s'il est présent au-delà du seuil toxique, pour lequel même les cofacteurs enzymatiques deviennent néfastes. Cd et Pb, qui n'ont pas de rôles biologiques connus, peuvent diminuer la perméabilité membranaire et ainsi modifier les flux cellulaires,

ce qui perturbe le métabolisme de manière globale (Baldrian 2006 ; Baldrian 2002 ; Lorenzo et al. 2006; Rivera-Hoyos et al. 2013).

Du fait de la grande surface des champignons (mycélium) et de leur tolérance souvent élevée, cette biosorption (liaison aux membranes et aux composés sécrétés) peut significativement diminuer la quantité d'éléments présents au sein de la matrice et diminuer la diffusion de ces éléments au sein de la biosphère (Danesh et al. 2013; Ali et al. 2017; Chatterjee et al. 2017). De nombreuses études ont montré la tolérance et l'efficacité des champignons dans la biosorption des métaux (Gadd 1994; Burford et al. 2003; Fomina and Gadd 2007; Danesh et al. 2013; Gadd 2017). Par exemple, Zotti et al (2015) ont montré que *Trichoderma harzianum* pouvait tolérer 200 $mg.L^{-1}$ de Cu et en biosorber environ 20 $mg.g^{-1}$. Li et al. (2017) montre que Cd à la dose de 10 $mg.L^{-1}$ ne perturbe pas le développement du mycélium de *Pleurotus ostreatus* (en milieu liquide). Mohammadian (2017) indique que *T. harzianum* peut aussi tolérer 35 $mg.L^{-1}$ de Cd et 650 $mg.L^{-1}$ de Pb. Les capacités de tolérance sont très variées en fonction des espèces fongiques et des métaux. La revue de Ali et al. (2017) évoque qu'*Agaricus arvensis* est capable de biosorber jusqu'à 0,05 $mg.g^{-1}$ de Cd et plus de 0,1 $mg.g^{-1}$ de Cu (en milieu liquide).

Comme le montre aussi le tableau 5, tous les groupes taxonomiques sont représentés (Zygomycètes, Ascomycètes et Basidiomycètes). *Phanerochaete chrysosporium* et *Pleurotus ostreatus* sont deux espèces très étudiées en bioremédiation, à la fois vis-à-vis de composés organiques et inorganiques. D'autres espèces sont aussi connues pour biodégrader des polluants organiques (*Absidia cylindrospora, Irpex lacteus, Agaricus* spp et *Penicillium* spp par exemple). Ce large spectre d'action est en faveur de l'utilisation des champignons en bioremédiation de pollutions complexes (Baldrian et al. 2000; Baldrian et al. 2005; Jiang et al. 2015). De plus, les champignons, sont parfois plus résistants et plus efficaces que les plantes, du moins en laboratoire (Henderson 2017 ; Cristaldi et al. 2017). Concernant les métaux, même si le potentiel est connu, peu d'études ont été réalisées en présence de souches fongiques isolées de sols, avec plusieurs métaux ou au sein de matrices complexes comme des sols réels.

Tableau 5 : revue non exhaustive de la littérature scientifique concernant la biosorption des métaux (en particulier Cd, Cu et Pb) par des espèces fongiques.

Espèce fongique	Métal biosorbé	Référence
Absidia orchidis	**Cd, Pb**	Holan et Volesky, 1995
Acremonium persicinum	**Cu, Zn**	Mohammadian, et al., 2017
Agaricus sp	**Cd, Cu, Pb,** Cr, Al,	Dhankar, *et al.*, 2015
Aspergillus niger	**Cd, Cu, Pb,** Zn, Ni, Co	Raja, et al., 2013 Lo, et al., 1999
Aspergillus sp	**Cd, Cu, Pb,** Zn, Co, Mn, Hg, Sr, As, Cr, Ni, U,	Dhankar, *et al.*, 2015
Bjerkandera sp	**Cu**	Li, et al., 2009
Cladosporium cladosporioides	**Cd, Cu, Pb,** Au, Pd, Pt, Zn, Al, Ni, Mn, Mg, Cr, Ca, Fe, U, As	Li, et al., 2009 Dhankar, *et al.*, 2015
Clonostachys rosea	**Cu**	Zotti, et al., 2015
Corollospora lacera	**Cd**	Taboski, et al., 2005
Cunninghamella echinulata	**Cu, Pb,** Zn,	Dhankar, *et al.*, 2015
Galerina vittiformis	**Cd, Cu, Pb**	Damodaran, et al., 2013
Ganoderma lucidum	**Cu**, U	Matute, et al., 2011 Dhankar, *et al.*, 2015
Gliomastix murorum	**Cu**	Li, et al., 2009
Monodictys pelagica	**Pb**	Taboski, et al., 2005
Mucor rouxii	**Cd, Cu, Pb,** Hg, Ni, Zn,	Dhankar, *et al.*, 2015 Marinez-Juarez, et al., 2012
Paecilomyces lilacinus	**Pb**	Zucconi, et al., 2003
Penicillium oxalicum	**Pb**	Xin, et al., 2010
Penicillium simplicissimum	**Cu,** Zn	Mohammadian, et al., 2017
Penicillium sp	**Cd, Pb,** Ni, Zn, As, U, Th, Sr, Hg	Dhankar, *et al.*, 2015
Phanerochaete chrysosporium	**Cd, Cu, Pb**	Li, et al., 2017 ; Chen, et al., 2015 ; Zhang, et al., 2016 ; Dhankar, *et al.*, 2015 ; Zhao, et al., 2016
Pleurotus cornucopiae	**Cd**	Jiang, et al., 2015
Pleurotus ostreatus	**Cd, Cu**	Favero, et al., 1991 ; Gabriel, et al., 2001 ; Javaid, et al., 2011 ; Li, et al., 2017
Pleurotus platypus	**Cd**	Vimala et Das, 2011
Pycnoporus sanguineus	**Cu**	Dhankar, *et al.*, 2015
Rhizopus arrhizus	**Cd, Cu**	Tobin, et al., 1984 ; Fourest, et al., 1994 Ahmad, et al., 2005 ; Naja, et al., 2005
Rhizopus sp	**Cd, Cu, Pb,** Zn, U, Co, Cr, Ni, Am	Dhankar, *et al.*, 2015
Saccharomyces cerevisiae	**Cd, Cu, Pb,** Au, Pd, Pt, Zn, Al, Ni, Mn, Mg, Cr, Ca, Fe, U, As, Hg	Dhankar, *et al.*, 2015 ; Tonk, 2011
Talaromyces helicus	**Cu**	Dhankar, *et al.*, 2015
Trametes sp	**Cd,** Al	Dhankar, *et al.*, 2015
Trametes versicolor	**Cu, Pb**	Lorenzo, et al., 2006
Trichoderma atroviride	**Cu**	Mohsenzadeh et Shahrokhi 2014
Trichoderma harzianum	**Cd, Cu, Pb**	Zotti, et al., 2014 Mohammadian, et al., 2017

V. Conclusion

Cette synthèse bibliographique a montré l'importance et la fragilité des sols, tant du point de vue écologique que pour le maintien des activités humaines. Parmi les contaminations métalliques des sols, Cd, Cu et Pb sont fréquents. Les pollutions métalliques sont complexes en raison de leur comportement chimique varié, mais aussi en fonction des propriétés des sols, ce qui conditionne en partie leur mobilité et donc leurs transferts au sein de la biosphère.

Les champignons sont des organismes très présents dans les sols où ils jouent des rôles écologiques importants. La grande surface que constitue leur mycélium, associée à leur grande capacité d'adaptation en font des organismes à haut potentiel pour le développement de méthodes biologiques de remédiation (mycoremédiation) basées sur la biosorption des métaux.

VI. Objectifs et démarche scientifique de la thèse

Dans un premier temps, nos objectifs ont été de déterminer si des souches fongiques isolées de sols contaminés et d'un sol forestier étaient capables de tolérer et de biosorber les 3 métaux Cd, Cu et Pb. Ensuite, nos objectifs ont consisté à mettre au point un microcosme de sol contaminé pour réaliser des essais de bioaugmentation par des souches fongiques capables de biosorber ces 3 métaux et d'appréhender l'impact de ces organismes fongiques sur la spéciation minéralogique des métaux.

Nos travaux ont suivi 3 étapes successives représentées sur la figure 11. Nous avons d'abord évalué les capacités de tolérance et de biosorption d'une souche modèle du laboratoire, *Absidia cylindrospora* vis-à-vis des 3 métaux (Cd, Cu et Pb). Les mesures de pH et de biomasse fongique dans ces conditions de stress métallique nous ont permis de sélectionner les paramètres permettant le screening d'autres isolats fongiques d'origine tellurique. Ainsi, 28 isolats fongiques issus de sols contaminés et d'un sol forestier ont été testés. Les résultats de ce screening nous ont conduit à sélectionner 3 isolats considérés comme étant les plus efficaces dans nos conditions expérimentales. Ceux-ci ont été utilisés dans les essais de bioaugmentation en microcosme de sol contaminé par les métaux. Un protocole d'extraction séquentielle des éléments métalliques nous a ensuite permis de doser les métaux dans les différentes fractions minéralogiques des microcosmes afin de mettre en évidence et de comparer les transferts des métaux, au sein de ces différentes fractions, suite au développement fongique.

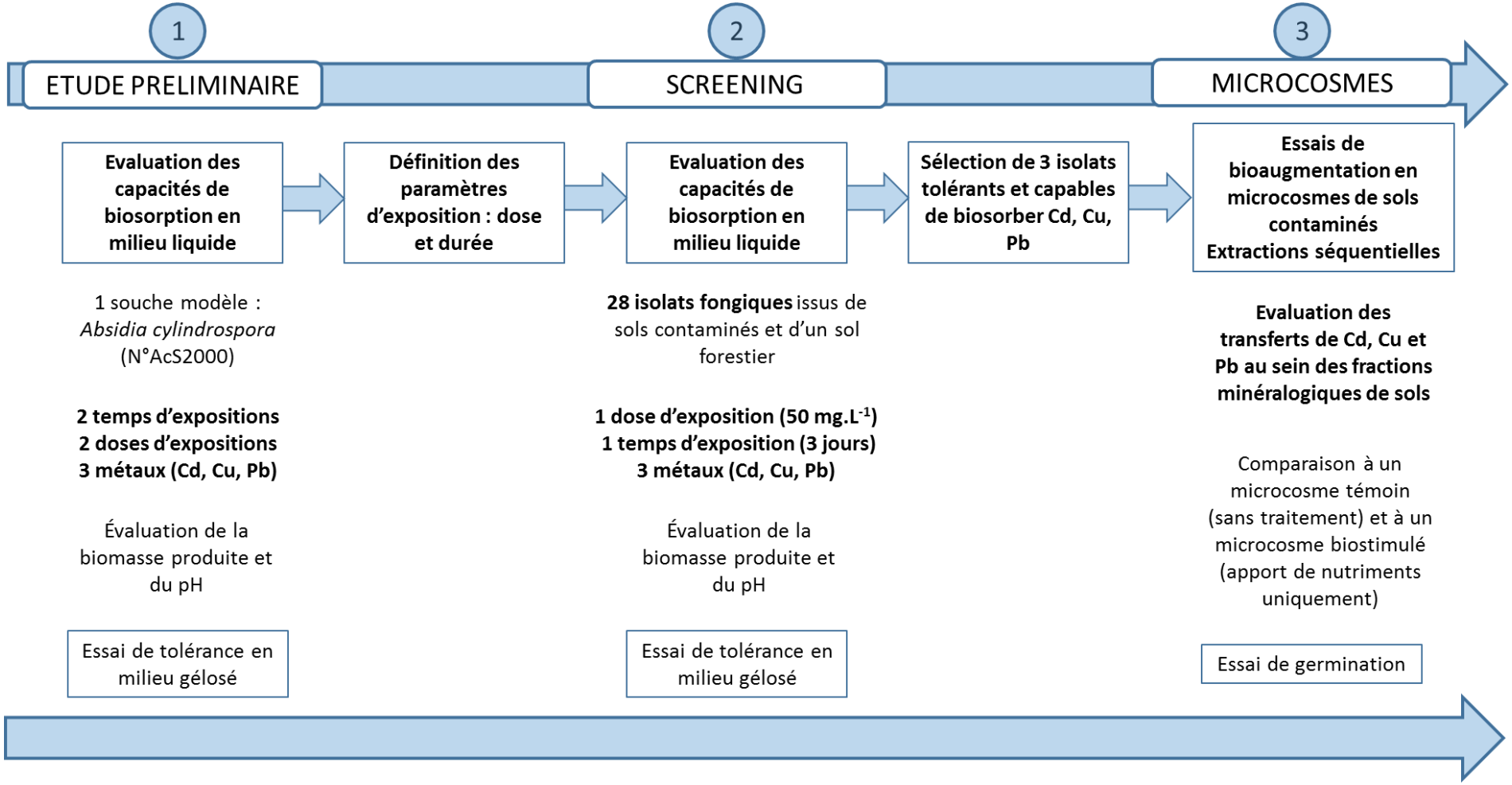


Figure 11 : schéma général du projet de thèse représentant la démarche et les principales étapes de travail.

Chapitre 2 :

Matériel et Méthodes

Nos travaux s'organisent en 3 parties principales :

- la première concerne la mise au point d'une méthode d'évaluation des capacités de biosorption de 3 métaux (Cd, Cu et Pb) en milieu liquide.

- la seconde porte sur l'application de cette méthode à 28 souches fongiques isolées de sols afin de sélectionner les plus performantes.

- enfin, la troisième partie concerne l'utilisation des isolats fongiques sélectionnés pour un test en microcosmes de sols contaminés par des métaux, afin d'évaluer l'influence du développement fongique sur la disponibilité des métaux, en vue d'une utilisation ultérieure en mycoremédiation.

I. Caractérisation d'isolats fongiques

En raison des capacités d'adaptation des champignons aux stress environnementaux, nous avons principalement choisi d'utiliser des sols contaminés (par des métaux et/ou des contaminants organiques) afin d'en isoler des souches fongiques potentiellement originales et adaptées à des stress métalliques. D'autres souches ont également été isolées à partir de sols forestiers. Plusieurs méthodes ont été utilisées afin d'isoler les espèces fongiques intégrées à l'étude. La méthode de Warcup (1950) et la méthode des suspensions-dilutions (Davet et Rouxel 1997) ont permis d'isoler les espèces appartenant à différents groupes taxonomiques issus de sols industriels. La mise en culture à partir de fragments de sporophores a également été utilisée pour l'isolement des espèces de Basidiomycètes forestiers. Tous les isolats purifiés ont été identifiés par microscopie et approche moléculaire avant d'être conservés au sein de la mycothèque du laboratoire ToxEMAC. Les compositions des milieux de culture utilisés sont détaillées dans l'annexe I (page 204).

I.1. Méthode par incorporation directe

Cette méthode est facile à mettre en œuvre et permet une bonne approche qualitative de la flore fongique d'un sol (Warcup 1950).

A partir d'un échantillon de sol, prélevé de manière aseptique, environ 10 mg de sol sont répartis dans 5 boîtes de Petri. Dans chacune, 15 à 20 mL de milieu de culture *Malt Extract Agar* (MEA) maintenu en surfusion sont ensuite ajoutés. Du chloramphénicol (Cooper®) à 0,2 $g.L^{-1}$ est ajouté au milieu de culture afin d'inhiber le développement de la flore bactérienne. Les boîtes sont ensuite incubées à 25°C. L'observation des boîtes se fait après 3 jours d'incubation et quotidiennement durant 15 jours afin de purifier et d'identifier les isolats fongiques cultivables.

I.2. Méthode des suspensions-dilutions

Cette méthode est complémentaire de la précédente car elle permet de mieux estimer la microflore à croissance lente (Davet et Rouxel 1997).

Cette méthode consiste à mettre du sol en suspension dans de l'eau stérile afin de réaliser différentes dilutions. Ces dilutions sont ensuite mélangées à un milieu de culture permettant d'isoler les champignons. Dans notre cas, 10 g de sol sont incorporés à 90 mL d'eau stérile, ce qui constitue la première dilution à 10^{-1}. A partir de cette dernière, des dilutions successives au dixième sont réalisées jusqu'à la dilution 10^{-6}. A partir de chaque dilution, 10 mL sont prélevés et ajoutés à 90 mL de milieu MEA maintenu en surfusion. Après homogénéisation, les 100 mL sont répartis dans 5 boîtes de Petri qui sont ensuite incubées à 25°C. Les boîtes sont ensuite observées quotidiennement et chaque colonie issue de chaque dilution est purifiée en vue d'être identifiée. Une méthode analogue est employée pour dénombrer les populations bactériennes avec un milieu de culture adapté (composition détaillées dans l'annexe I, page 204).

I.3. Récolte et mise en culture des sporophores forestiers

Les sporophores de Basidiomycètes ont été récoltés dans la forêt de Cerisy, située en Normandie (50680, Cerisy-la-Forêt). Il s'agit d'une forêt de bois mêlés dominés par le hêtre, en zone Natura 2000. Les sporophores de champignons forestiers ont été identifiés sur le terrain en se basant sur des ouvrages de référence (Bon 2012; Courtecuisse et Duhem 2013). De retour au laboratoire, des fragments de

sporophores (environ 1 mm^3) sont prélevés et lavés à l'éthanol 70% (v/v). Chaque fragment est ensuite déposé sur un milieu gélosé MEA, puis incubé à 25°C. La reprise est suivie quotidiennement jusqu'à obtention d'une culture pure (figure 12).

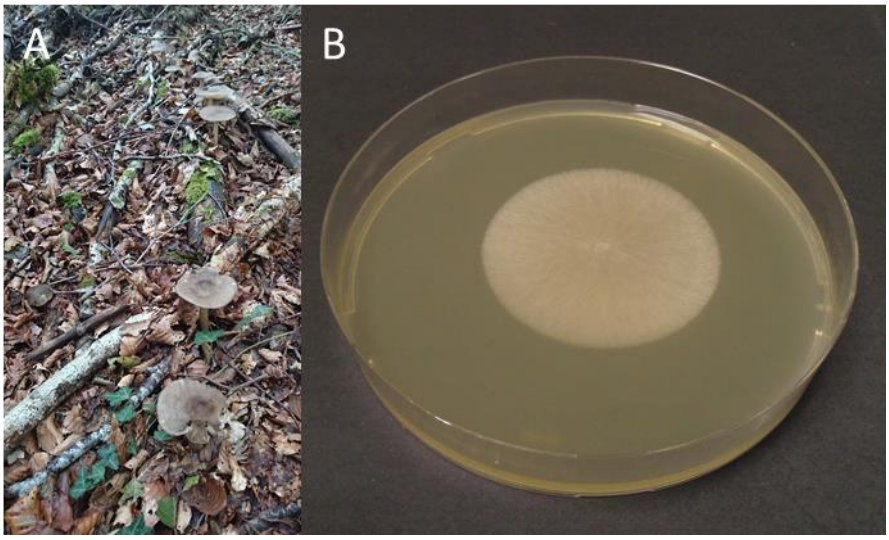


Figure 12 : sporophores de Megacollybia platyphylla dans leur milieu forestier naturel (A) et mycélium purifié sur milieu MEA (B). (Source : laboratoire ToxEMAC, Albert)

I.4. Identification des champignons

I.4.1. Approche culturale et microscopique

L'identification des isolats a été réalisée sur la base d'arguments morphologiques en réalisant des observations macroscopiques et microscopiques (Olympus CX 31®, grossissement 400 et 1000) à partir des cultures pures des champignons isolés. L'identification morphologique se base sur différents ouvrages de références : Booth (1971); Von Arx (1974); Pitt (1979); Domsch et al. (1995); Pitt (2000); Klich (2002); Bon (2012) et Courtecuisse et Duhem (2013), ainsi que sur les observations des souches constituant la mycothèque du laboratoire (plus de 1500 souches représentant une large diversité taxonomique et géographique).

I.4.2. Approche moléculaire

I.4.2.1. Extraction d'ADN fongique

A partir d'une culture pure

Le kit NucleoSpin Plant II® (Macherey-Nagel) permet en quelques étapes d'extraire l'ADN fongique à partir d'une culture pure. La surface de la culture est grattée à l'aide d'un scalpel stérile afin de prélever le mycélium qui est ensuite déposé dans un tube Eppendorf® Safe Lock de 2 mL contenant 1 g de billes de verres de 1 mm de diamètre et 2 billes de verres de 5 mm de diamètre. Les étapes du protocole sont détaillées dans l'annexe II (page 206). L'action combinée des billes de verres et d'une agitation mécanique (Tissue Lyser Qiagen®, 15 min, 20 Hz) permet de fracturer la paroi fongique et les membranes cellulaires afin de libérer les acides nucléiques. Les étapes suivantes permettent de purifier l'ADN.

A la fin de l'extraction, le dosage de l'ADN extrait est réalisé à 280, 260 et 230 nm sur un spectromètre UV-visible (Nanodrop®). Plusieurs ratios sont calculés afin de déterminer la quantité et la qualité de l'ADN extrait. L'absorbance à 260 nm (A260), permet de doser l'ADN. L'absorbance à 280 nm (A280) est indicatrice des acides nucléiques simples brins et de l'ARN. L'absorbance à 230 nm (A230) est indicatrice de la présence d'ADN, d'acides humiques, de protéines, de saccharides. Les ratios A260/A230 et A260/A280 sont calculés. Les valeurs cibles sont données dans le tableau 6. Le ratio A260/A230 doit-être supérieur à 2, ce qui signifie que l'ADN est majoritaire et théoriquement peu contaminé par d'autres macromolécules potentiellement extraites en même temps que les ADN d'intérêts. Le ratio A260/A280 (valeur cible entre 1,8 et 2) représente la contamination par des acides nucléiques simples brins (ADN et ARN) ou des protéines qui ont pu être extraits en même temps que les ADN d'intérêts. Les ADN utilisés pour nos expériences respectent tous ces valeurs cibles.

Tableau 6 : valeurs cibles et interprétation des ratios calculés à partir des absorbance des extraits d'ADN à 230, 260 et 280 nm.

Ratio calculé	Valeur cible	Interprétation des résultats
A260/A230	>2	Si ce ratio est inférieur à < 2 l'ADN est considéré comme contaminé par des protéines, des saccharides, des acides humiques
A260/A280	1,8 - 2	Si < 1,8 : contamination par des protéines
		Si > 2 : contamination par des acides nucléiques simples brins (ARN ou ADN dénaturé).

A partir d'un échantillon de sol

Le kit NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel®) permet d'extraire les ADN eucaryotes d'un échantillon de sol. Il fonctionne sur le même principe que l'extraction à partir d'une culture pure et son protocole est détaillé dans l'annexe II (page 206). La prise d'essai est une masse de sol comprise entre 300 et 500 mg que l'on dépose dans un tube rempli de billes de verre (paragraphe I.4.2.1 page 75). L'étape de lyse par agitation mécanique doit cependant être plus douce (en particulier pour les échantillons pauvres en ADN). Une agitation trop prononcée ne permet pas une bonne extraction. Le kit propose plusieurs versions de protocoles. Deux tampons de lyses sont proposés (SL1 ou SL2), à utiliser chacun avec ou sans promoteur (SX) qui permet de limiter l'inhibition et la contamination de l'extraction par d'autres macromolécules (acides humiques, protéines). Il y a donc 4 possibilités de protocoles au total (SL1+SX ; SL1-SX ; SL2+SX et SL2-SX). Toutes les conditions ont été testées au cours d'essais préliminaires sur des sols pollués conservés à +4°C. Le protocole SL1+SX a donné les meilleurs résultats d'extraction (meilleur rendement d'extraction et ADN de meilleure qualité) et a donc été utilisé pour nos expériences. Le dosage de l'ADN est effectué comme précédemment.

I.4.2.2. PCR

Le mélange réactionnel permettant la réaction de PCR est décrit dans tableau 7. Ces volumes sont donnés pour une réaction de PCR. Il faut donc multiplier ces volumes par le nombre de réactions à réaliser. Des témoins sont également réalisés : un témoin négatif (eau distillée) et un témoin positif (ADN pur et connu d'*Absidia cylindrospora*). La Taq polymerase (Roche®) doit être ajoutée en dernier,

après agitation du mélange, et le mélange obtenu doit ensuite être homogénéisé délicatement uniquement par aspiration-refoulement.

Le tableau 8 présente les séquences des amorces utilisées pour les réactions de PCR. Au cours d'essais de mise au point, des PCR ont été réalisées avec d'autres couples d'amorces cités dans ce tableau mais ne se sont pas révélés concluants. Ces essais avaient pour but d'améliorer la précision des identifications moléculaires. Seules les PCR réalisées avec les amorces ITS1/4 et ITS5/4 ont été utilisées pour identifier les champignons.

Tableau 7 : préparation du mélange pour PCR avec de l'ADN pur.

Réactifs	Volume
Tampon Taq polymerase 10x (Roche®)	5 µL
dNTP (Roche®)	1 µL
Amorce forward (Eurogentec®)	1 µL
Amorce reverse (Eurogentec®)	1 µL
Taq polymerase (Roche®)	0,2 µL
H_2O	qsp 50 µL

Pour chaque échantillon, 50 à 100 ng d'ADN sont déposés dans un tube Eppendorf® de 0,5 mL puis recouverts par 50 µL de mélange pour PCR. L'ensemble est homogénéisé délicatement par aspiration-refoulement. Pour certaines PCR, une supplémentation en nucléotides G et C peut être nécessaire. Il faut alors ajouter au mélange pour PCR 10 µL d'une solution de GC (GC-rich sol 5x, Roche®). Cette supplémentation est importante pour les ADN riches en bases G et C pour lesquels les quantités apportées par un mélange classique de nucléotides ne sont pas suffisantes et empêchent l'amplification par PCR (réactif limitant).

Tableau 8 : liste des amorces, et séquences correspondantes, utilisées dans nos travaux.

Nom	Sens	Séquence	Référence
ITS1	forward	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'	Schoch, 2012
ITS4	reverse	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	Schoch, 2012
ITS1f	forward	5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3'	Schoch, 2012 Manter, 2007
ITS5	forward	5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'	Yilmaz, 2014 ; Schoch, 2012
ITS2	reverse	5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3'	Toju, 2012
ITS1-86f	forward	5'-GTG AAT CAT CGA ATC TTT GAA-3'	Op De Beeck, 2014
FR1	forward	5'-ANC CAT TCA ATC GCT ANT-3'	Toju, 2012
FF390	reverse	5'-CGA TAA CGA ACG AGA CCT-3'	Toju, 2012

Pour les PCR à partir d'ADN extraits de sol, une autre enzyme doit être ajoutée au mélange pour PCR. Il s'agit de la T4 gene32 protein (BioLabs®). Cette dernière permet de protéger la Taq polymérase des inhibiteurs éventuellement extraits avec l'ADN lors de la phase d'extraction. Le mélange est décrit dans le tableau 9.

Tableau 9 : préparation du mélange pour PCR avec de l'ADN extrait à partir de sol.

Réactifs	Volume
Tampon Taq polymerase 10x (Roche)	5 µL
dNTP (Roche)	1 µL
Amorce forward (Eurogentechs)	1 µL
Amorce reverse (Eurogentechs)	1 µL
Taq polymerase (Roche)	0,2 µL
T4 gene32 protein (BioLabs®)	0,1 µL
H_2O	qsp 50 µL

Les cycles de réactions de PCR se composent de 3 phases principales. La première phase de dénaturation de l'ADN se fait par chauffage à 95°C et permet de dénaturer l'ADN double brin en ADN simple brin. La phase d'hybridation permet la réaction avec la Taq polymérase sur les brins d'ADN. Enfin, la phase d'élongation permet la synthèse du brin d'ADN complémentaire. Les cycles sont programmés comme indiqué dans le tableau 10 pour toutes nos PCR (thermocycleur Eppendorf Mastercycler Personnal®).

Tableau 10 : programmation des cycles de PCR.

Etape de la PCR	Température	Durée
1 Dénaturation initiale	95°C	4 min
2 Dénaturation	95°C	30 s
3 Hybridation	52°C	30 s
4 Elongation	72°C	1 min
5 Répétition des étapes 2 à 4 (30 cycles)		
6 Elongation finale	72°C	7 min

Une fois la réaction terminée, la qualité de la PCR est vérifiée en faisant migrer les amplicons sur un gel d'agarose à 1% contenant un marqueur d'ADN, ou tampon de charge (Midori® green, Nippon Genetics Europe®). Pour la migration proprement dite, chaque échantillon (5 µl de produit de PCR), ainsi que 5 µL d'un marqueur de taille (1 kb DNA Ladder, Promega®), sont mélangés avec 1 µL de marqueur d'ADN. Chaque mélange est déposé dans un des puits du gel. La migration se fait à 80 V, 500 mA, pendant 40 min (générateur Fischer Bioblock Scientific®). Une fois la migration terminée, le gel est révélé sous UV à 280 nm (banc UV Bioblock Scientific®).

I.4.2.3. Séquençage

Les séquençages ont été réalisés par la société GATC-Eurofins®. Les échantillons à séquencer sont des amplicons de PCR obtenus selon le protocole décrit au paragraphe I.4.2.2 (page 76). A ces fins, 20 µL de produit PCR sont déposés dans un tube Eppendorf® de 1,5 mL. La concentration en ADN doit être comprise entre 10 et 50 $ng.L^{-1}$. Un échantillon d'amorces est aussi envoyé pour le séquençage.

Les séquences reçues doivent ensuite être analysées. Pour cela, des fichiers textes (.txt) comprenant les séquences "propres" (avec uniquement des bonnes correspondances de séquences) sont fournies par GATC®. Les logiciels SnapGene®Viewer ou GATC®Viewer ont été utilisés pour vérifier la qualité des chromatogrammes (résolution des pics) et des séquences. L'ensemble des séquences obtenues est indiqué dans l'annexe III (page 209).

Ces séquences sont ensuite alignées avec les séquences des bases de données pour identifier les organismes fongiques. Les bases de données BLAST® (NCBI, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) et Mycobank® (Robert et al. 2013, http://www.mycobank.org/) ont été utilisées. Cette dernière est une

base spécifique aux champignons gérée par l'*International Mycological Association*. Dans tous les cas, l'identification est jugée satisfaisante pour des pourcentages de recouvrement et d'analogie d'au moins 98%. Les identifications moléculaires ont ensuite été confrontées aux identifications morphologiques (microscopie).

II. Etude des interactions entre les isolats fongiques et les métaux

L'étude des interactions entre les champignons et les métaux a consisté en trois expériences principales. La première a permis d'évaluer la tolérance (en milieu gélosé) des isolats fongiques aux trois métaux testés dans l'étude (chapitre 2, paragraphe II.1, ci-dessous). La seconde expérience a permis de déterminer les capacités de biosorption des métaux (en milieu liquide) pour chaque isolat fongique (chapitre 2, paragraphe II.2, page 82). Cette expérience a permis de sélectionner les champignons présentant les meilleurs potentiels pour réaliser les essais en microcosmes de sols dont la mise au point constitue le troisième volet de notre étude (chapitre 2, paragraphe II.3, page 85).

II.1. Essai de tolérance en milieu gélosé

Chacun des 28 isolats fongiques a été cultivé en présence d'une gamme de concentration de chacun des 3 métaux étudiés (Cd, Cu et Pb). Chaque essai de tolérance a été réalisé en triplicat aux concentrations suivantes : 0 (témoin), 10 ; 50 ; 100 et 1000 $mg.L^{-1}$. Les concentrations en métaux choisies correspondent à celles fréquemment retrouvées dans la littérature pour ce type de test (Xiangliang et al. 2005; Li et al. 2009; Zotti et al. 2014; Nongmaithem et al. 2016; Li et al. 2017).

II.1.1. Préparation des géloses enrichies en métaux

Le milieu MEA (Difco®) a été utilisé pour la plupart des isolats. Pour 5 isolats (*Agaricus bisporus, Agaricus arvensis, Perenniporia fraxinea, Emericellopsis minima, Fusarium oxysporum* et *Coniochaeta*

hoffmannii), le milieu MEA ne permettait pas une croissance suffisamment rapide. Le milieu *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Difco®) a donc été utilisé.

Afin d'enrichir ces milieux de culture en métal, des sels de Cd, Cu ou Pb ont été ajoutés après stérilisation des milieux maintenus en surfusion. Les sels utilisés (tableau 11) sont tous de qualité analytique pour chaque métal (Sigma Aldrich®). Les solutions mères (1 $g.L^{-1}$) sont préparées en solubilisant une masse appropriée de sels de métaux dans de l'eau ultra pure en conditions aseptiques puis conservées à +4°C avant utilisation. La masse nécessaire de sel métallique est directement solubilisée dans le milieu de culture pour la plus forte concentration. Un volume d'environ 20 mL de milieu enrichi est ensuite déposé dans une boîte de Petri. Les milieux enrichis sont prêts à être utilisés après solidification de la gélose. Si besoin, ces derniers sont conservés à +4°C avant utilisation.

Tableau 11 : données de préparation des solutions mères de sels de métaux.

métal	Masse molaire du métal ($g.mol^{-1}$)	Sel	Masse molaire du sel ($g.mol^{-1}$)	Masse de sel pesée (g)	Volume d'eau (L)
Cd	112,41	**$CdSO_4$**	208,47	1,800	1
Cu	63,54	**$CuSO_4$, $5H_2O$**	249,68	3,900	1
Pb	207,20	**$Pb(NO_3)_2$**	331,21	1,600	1

II.1.2. Ensemencement et suivi de la croissance

Un prélèvement de mycélium (2 mm^3) est réalisé à partir d'une pré-culture pour chaque isolat et déposé au centre de la gélose enrichie en métal. Les géloses ensemencées sont ensuite incubées à 25°C pendant 30 jours. Trois réplicats par métal et par concentration sont réalisés. Un témoin sans métal est aussi réalisé en triplicat pour chaque isolat.

La croissance fongique est suivie tous les jours en mesurant le diamètre de croissance du mycélium considéré (figure 13). Une moyenne de deux mesures (diamètres perpendiculaires) est enregistrée. L'ensemble des mesures permet de déterminer, pour chaque métal, des courbes de croissance en fonction

des concentrations en métal. Lorsqu'une concentration de métal inhibe totalement la croissance d'un isolat, ce dernier est à nouveau transféré sur un milieu vierge sans métal, afin d'évaluer le caractère fongicide ou fongistatique de la dose considérée.

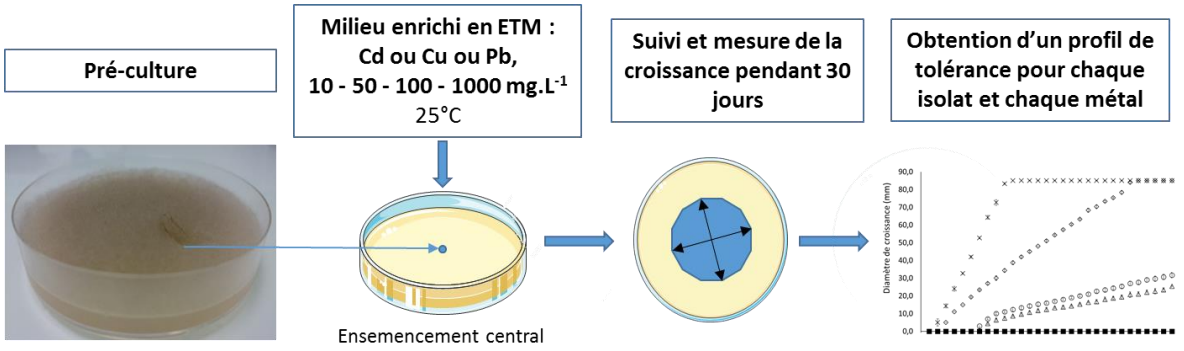


Figure 13 : schéma de l'expérience de tolérance en milieu gélosé. La photographie représente A. cylindrospora sur boîte de Petri (milieu MEA).

II.2. Essai de biosorption en milieu liquide

Absidia cylindrospora (Hagem, 1908) est une souche appartenant aux Mucoromycota (ordre des Mucorales). L'isolat utilisé dans cette étude est issu de la mycothèque du laboratoire (n°AcS2000). Cet isolat est déjà connu pour dégrader un hydrocarbure aromatique polycyclique, le fluorène (Garon et al. 2004). L'expertise du laboratoire et la facilité de manipulation de cette espèce nous ont conduit à l'utiliser pour développer les premiers tests de biosorption en milieu liquide. Cette étude préliminaire permet de sélectionner les paramètres de temps et de doses d'exposition qui seront ensuite appliqués à l'ensemble des 28 isolats fongiques de l'étude.

II.2.1. Mise au point avec *Absidia cylindrospora*

Le mycélium de cet isolat est gratté à l'aide d'un scalpel stérile depuis une pré-culture (milieu MEA, 10 jours, 25°C) puis transféré en milieu malt liquide (25 mL). Une période d'adaptation de 3 jours est respectée (20°C, agitation orbitale à 150 rpm). Les métaux sont ensuite ajoutés à partir des solutions mères (paragraphe II.1.1, page 80). Les paramètres d'exposition sont fixés à 50 et 100 $mg.L^{-1}$ pendant 3 et 7 jours, en accord avec la littérature (Zotti et al. 2014; Nongmaithem et al. 2016; Li et al. 2017). Pour

chacun des 3 métaux, le mycélium est donc exposé à 2 doses distinctes et à 2 durées différentes pour chaque dose. Chacune de ces 12 conditions est réalisée en triplicat. A la fin du temps d'exposition considéré, le mycélium est filtré sur gaze stérile, rincé 2 fois à l'eau ultra pure (25 mL). Trois fractions sont ainsi obtenues : le milieu de culture, l'eau de rinçage et le mycélium. Celles-ci sont conservées à -20°C avant analyse, le mycélium étant préalablement séché à l'étuve (45°C jusqu'à obtention d'une masse constante) et pesé. La figure 14 présente les étapes de cette expérience.

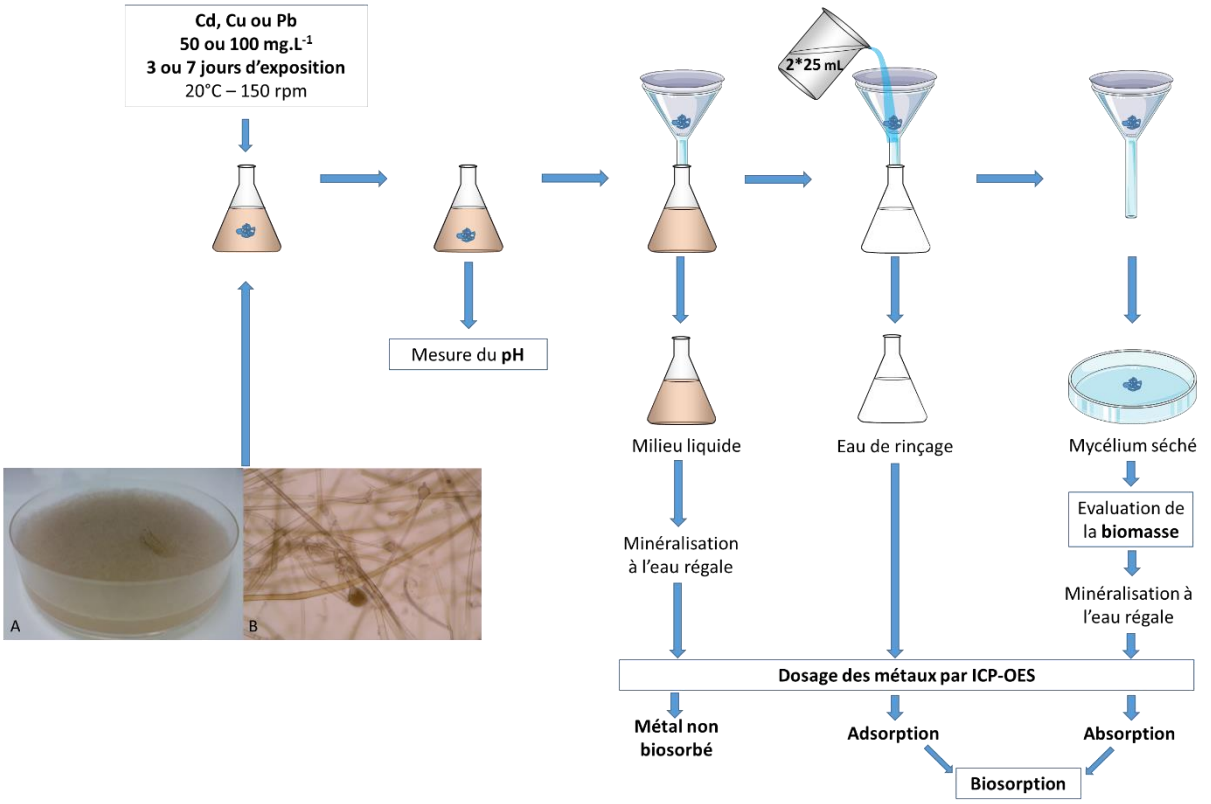


Figure 14 : schéma de l'expérience de biosorption en milieu liquide avec Absidia cylindrospora ; photo A : A. cylindrospora sur boîte de Petri (milieu MEA) ; photo B : structures microscopiques d'A. cylindrospora (×1000) (d'après Albert et al. 2018).

II.2.2. Screening des 28 isolats fongiques

Le protocole décrit au paragraphe II.2.1 a été appliqué aux 28 isolats de l'étude (incluant à nouveau *Absidia cylindrospora*) avec la dose d'exposition de 50 $mg.L^{-1}$, pendant 3 jours. Chaque isolat a été testé en triplicat. Les pré-cultures sont réalisées sur milieu MEA, sauf pour les 5 isolats pour lesquels le milieu PDA est plus adapté à la croissance (paragraphe II.1.1, page 80). L'essai de biosorption en milieu liquide est en revanche réalisé en milieu liquide à l'extrait de malt (MEA) pour tous les isolats afin de pouvoir comparer tous les isolats dans les mêmes conditions.

II.2.3. Paramètres mesurés

II.2.3.1. pH

Au cours de l'expérience de biosorption, le pH du milieu a été mesuré (sonde pH 1100 VWR®, étalonnée avec 2 solutions étalons du fabricant, à pH = 4 et à pH = 7) avant l'ajout des sels métalliques, puis à la fin du temps d'exposition pour l'ensemble des réplicats. Le milieu de culture seul, le milieu de culture avec des sels métalliques (sans mycélium) et le milieu de culture avec les mycéliums (sans métal) ont servi de témoins et ont été comparés aux valeurs obtenues à la fin de l'expérience.

II.2.3.2. Biomasse fongique

La biomasse produite est mesurée à la fin de l'exposition, après séchage du champignon à 45°C (balance de précision CPD Sartorius®, précision 0,1 mg). Cette masse permet d'estimer la croissance du mycélium dans le milieu de culture. En effet, la biomasse produite (BP) de chaque réplicat est exprimée en pourcentage de la biomasse mesurée (BM) sur la biomasse du témoin (BT) sans métal, selon l'équation :

$$BP = BM / BT \qquad (1)$$

II.2.3.3. Métaux biosorbés

Les métaux ont été dosés par ICP-OES (paragraphe III.1, page 91) dans les 3 fractions obtenues en fin d'expérience (mycélium, eau de rinçage, milieu liquide, figure14). Une étape de filtration (0,45µm Millex®) est nécessaire avant le dosage. Les résultats obtenus ont permis de mesurer la quantité de métal adsorbée sur le mycélium (Q_{ADS}, en mg), ainsi que la quantité de métal absorbée (Q_{ABS}, en mg). Le total du métal biosorbé a été calculé comme la somme des quantités de métal adsorbées et absorbées (Q_{BIOS}, en mg). Les résultats sont exprimés en pourcentage de métal adsorbé, absorbé et biosorbé par rapport à la quantité totale de métal présente dans le milieu de culture (Q_0, en mg) (équations 2 à 4). La

concentration de métal biosorbé (C_{BIOS}, en $mg.g^{-1}$) a aussi été calculée en tenant compte de la biomasse mesurée pour chaque isolat (équation 5).

$$\%_{ADS} = Q_{ADS} / Q_0 \quad (2)$$

$$\%_{ABS} = Q_{ABS} / Q_0 \quad (3)$$

$$\%_{BIOS} = (Q_{ADS} + Q_{ABS}) / Q_0 \quad (4)$$

$$C_{BIOS} = (Q_{ADS} + Q_{ABS}) / BM \quad (5)$$

II.3. Essais de mycoremédiation en microcosmes de sol

Le but de cet essai est de montrer l'influence du développement fongique sur la disponibilité des métaux et leurs transferts (figure 6). Deux approches ont été testées :

- la biostimulation, qui consiste à apporter uniquement des nutriments afin de stimuler la flore endogène. Ces nutriments sont constitués par de la sciure de hêtre (source de carbone), un milieu minéral minimum (milieu de Galzy et Slonimski dont la composition est détaillée dans l'annexe I, page 204) et de l'eau. Le milieu de Galzy et Slonimski contient entre autre Ca, Cu, K, Mg, Na et Zn mais l'apport représente moins de 0,01% m/m de chaque élément (annexe VIII, page 255).

- la bioaugmentation, qui consiste à apporter, en plus des nutriments, une espèce fongique n'appartenant pas à la flore endogène du sol contaminé. Des essais de bioaugmentation ont été réalisés avec 3 isolats préalablement sélectionnés pour leur efficacité lors de l'étude de biosorption en milieu liquide précédemment décrite (paragraphe II.2.2., page 83) : *Absidia cylindrospora*, *Chaetomium atrobrunneum* et *Coprinellus micaceus*.

Un microcosme témoin sans apport nutritif et sans apport de souche fongique a également été réalisé. Tous les essais ont été réalisés en triplicat.

II.3.1. Préparation des microcosmes

Les études de l'influence du développement fongique sur la spéciation et les transferts de métaux sont peu nombreuses dans la littérature scientifique. Pour développer notre test, nous nous sommes inspirés de tests existants pour la biodégradation des HAP (Garon et al. 2004; Rafin et al. 2015).

II.3.1.1. Mise au point de l'essai

Des tests préliminaires avec *Absidia cylindrospora* ont été réalisés pour sélectionner les paramètres optimums de l'essai (tableau 12). Il s'est avéré qu'une pré-incubation du mycélium mélangé à la sciure ne permettait pas un développement fongique visuellement différent à la fin des 20 jours de l'essai en microcosme. Un apport d'eau était nécessaire. Cependant, les volumes de 20 et de 40 mL étaient trop important et engendraient une boue qui ne permettait pas un développement optimal du mycélium (tableau 12, essai F). Enfin, la distribution en mélange est celle qui a permis le meilleur développement fongique par rapport à une distribution en 2 couches successives (1 couche de sciure mélangée au mycélium recouverte par 1 couche de sol (tableau 12, essais A, B et C), ou en 3 couches, c'est-à-dire, une couche de sciure mélangée au mycélium entre 2 couches de sol (tableau 12, essais G et H). Les valeurs de l'essai D, en gras dans le tableau 12 ci-dessous ont été retenues pour l'ensemble des essais réalisés ultérieurement.

Tableau 12 : paramètres testés pour la mise au point de l'essai en microcosme de sol pollué.

Essais	A	B	C	**D**	E	F	G	H
Milieu - volume (mL)	GS-15	GS-15	GS-15	**GS-15**	GS-15	GS-25	GS-25	MEA-25
Pré-incubation (48h 25°C)	oui	oui	non	**non**	oui	non	non	non
sol (g)	30	60	60	**60**	60	60	40×2*	40×2*
H_2O (mL)	0	10	10	**15**	10	25	40	40
Organisation	2 couches	2 couches	2 couches	**mélange**	mélange	boue	3 couches	3 couches

GS : Galzy et Slonimski

* : Une masse de 40 g a été utilisée pour chacune des 2 couches de sol.

II.3.1.2. Protocole appliqué lors de notre étude

La figure 15 schématise les différentes étapes de la préparation d'un microcosme. Le mycélium d'une pré-culture est gratté à l'aide d'un scalpel stérile puis transféré dans 15 mL de milieu de GS. Il s'agit d'un milieu minimum, pauvre en sucres, composé principalement de minéraux essentiels (milieu de survie). Le mycélium ainsi transféré est broyé à l'ultra turrax® (IKA, tête n°8). Le broyat mycélien ainsi obtenu est mélangé à 3 g de sciure de hêtre stérilisée. Cette préparation est ensuite mélangée à 60 g de sol pollué. Une humidification est réalisée avec 15 mL d'eau distillée. Le microcosme ainsi préparé est recouvert d'un film plastique afin de garantir une humidité constante pendant la durée de l'essai. Le microcosme est ensuite incubé à 25°C. Le microcosme biostimulé a été préparé de la même façon mais sans champignon. Le témoin a été préparé de la même façon, mais sans champignon et sans milieu GS.

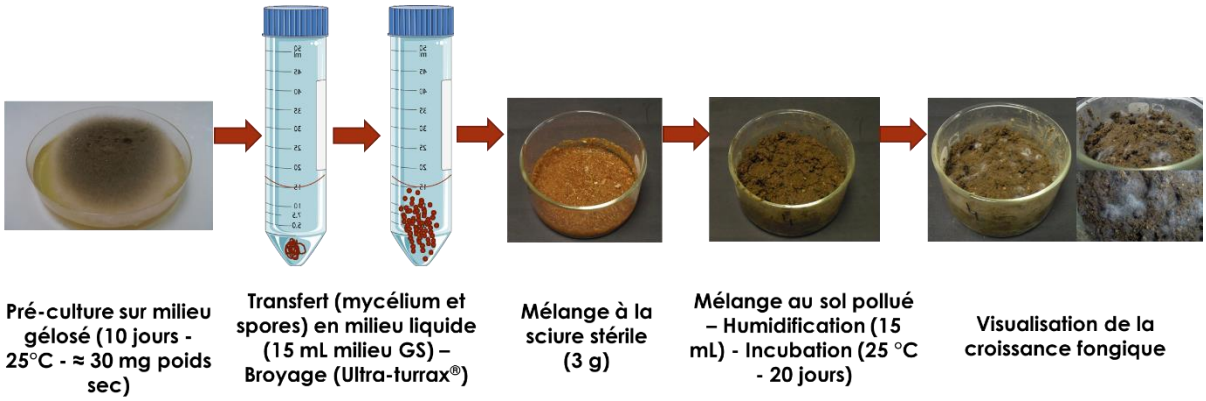


Figure 15 : mode de préparation d'un microcosme de sol avec Absidia cylindrospora.

II.3.2. Paramètres mesurés

Plusieurs paramètres sont mesurés afin de caractériser le sol utilisé pour préparer les microcosmes et de suivre l'impact de la biostimulation et de la bioaugmentation fongique.

II.3.2.1. Carbonates

Le dosage des carbonates (figure 16) est adapté de la norme NF ISO 10693. La teneur en carbonates (CO_3^{2-}) est déterminée par la mesure du CO_2 dégagé lors de l'acidification de l'échantillon selon la réaction (6).

$$CO_3^{2-} + 2H_3O^+ \Leftrightarrow CO_2 + 3H_2O \qquad (6)$$

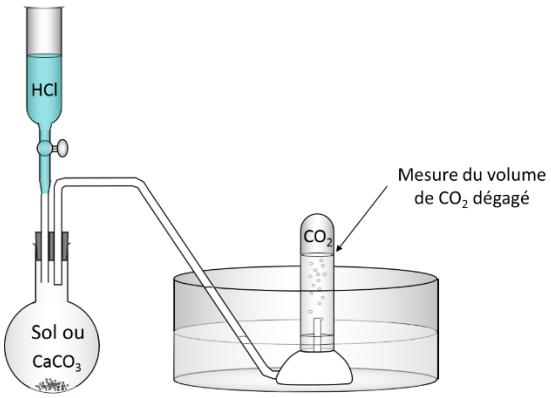


Figure 16: schéma du montage pour la détermination de la teneur en $CaCO_3$ d'un sol.

La prise d'essai (étalon ou échantillon), de masse m connue est introduite dans le ballon, 10 mL d'HCl 6 M (qualité analytique, Carlo Erba®) sont introduits et le volume de CO_2 dégagé suite à la réaction (6) est alors mesuré. Les teneurs en carbonates sont obtenues après étalonnage externe ($CaCO_3$ pur).

II.3.2.2. Carbone organique total (COT)

Le protocole appliqué est basé sur la norme ISO 14235 modifiée. Le carbone organique (C) est oxydé à chaud par un excès de dichromate en milieu acide (acide sulfurique) selon l'équation (7). La quantité de Cr(VI) réduit est déterminée par une mesure spectrophotométrique (absorbance UV-vis à 585 nm, spectromètre Pharmacia Biotech Novaspec II). Un étalonnage externe direct est réalisé avec du glucose pur ($C_6H_{12}O_6$) et permet de quantifier directement à partir de la mesure d'absorbance, la teneur en COT.

$$3\ C + 2\ Cr_2O_7^{2-} + 16\ H^+ \Leftrightarrow 4\ Cr^{3+} + 8\ H_2O + 3\ CO_2 \qquad (7)$$

II.3.2.3. Mesure du pH

Le pH du sol est mesuré selon la norme ISO 10390. Cette technique mesure le pH qui correspond à l'acidité réelle due aux ions H_3O^+ libérés dans la solution du sol. Une prise d'essai de 5 g de sol est mise en suspension dans 25 mL d'eau ultra pure. La suspension est agitée pendant 1 h (agitation orbitale à 250 $tr.min^{-1}$), puis laissée à reposer pendant 2 h, à température ambiante. Le pH est ensuite mesuré à l'aide d'une sonde (pH1100 VWR®, étalonnée avec les 2 solutions étalons du fabricant à pH = 4 et pH = 7). Les valeurs retenues sont exprimées par les moyennes d'au moins 3 réplicats pour chaque mesure.

II.3.2.4. Espèces fongique viables (microfonge)

La flore fongique du sol industriel utilisé pour réaliser les essais en microcosme de sol a été étudiée selon la méthode par incorporation directe et la méthode des suspensions-dilutions (chapitre 2, paragraphes I.1 et I.2, page 72). Un dénombrement fongique et bactérien (en Unité Formant Colonie, UFC) a été réalisé à partir des suspension-dilutions. Les espèces fongiques ainsi isolées et purifiées ont ensuite été identifiées par approche microscopique et moléculaire, comme décrites au chapitre 2, paragraphe I.4 (page 74).

A la fin des 20 jours de l'essai, la flore de surface a été isolée et purifiée afin de vérifier que l'isolat d'intérêt utilisé en bioaugmentation était bien présent dans le microcosme. Une vérification moléculaire a aussi été réalisée pour le microcosme bioaugmenté avec *A. cylindrospora*. Les ADN fongiques totaux de tous les microcosmes (témoins, biostimulés, et bioaugmentés) ont aussi été extraits (chapitre 2, paragraphe I.2, page 76) en vue d'une étude ultérieure de la microfonge par approche métagénomique.

II.3.2.5. Eléments traces métalliques

Les teneurs totales élémentaires des métaux étudiés ainsi que leur répartition dans les différentes fractions minéralogiques sont déterminées dans les sols. Les méthodes sont décrites au paragraphe III de ce chapitre (page 91).

II.3.2.6. Evaluation de l'écotoxicité

Un essai de germination a été réalisé afin de mesurer l'évolution de la toxicité du sol vis-à-vis de la croissance de végétaux, selon la norme NF ISO 11269-1. Conformément à la norme, un sol ISO a été reconstitué (tableau 13) afin de diluer la pollution du sol étudié (le sol non dilué ne permettant pas la pousse des graines). Deux dilutions ont été retenues pour nos essais : 50 et 75% (m/m) (Eom et al. 2007) et sont appliquées au sol industriel pollué, au microcosme biostimulé et au microcosme bioaugmenté avec *A. cylindrospora*. En parallèle, 3 témoins sont réalisés : avec du sable, du terreau et avec le sol ISO pur.

Tableau 13 : composition du sol ISO reconstitué selon la norme NF ISO 11269-1.

Composant	% (m/m)	masse (g)
Tourbe de sphaigne	10,0	100
Kaolinite	20,0	200
Sable fin de Fontainebleau	69,5	695
Carbonate de calcium	0,5	5
		qsp 1000

Des graines d'orge (*Hordeum vulgare* L.) non traitées (désinfection à l'eau bouillante par le fournisseur, Bavichi®) sont d'abord pré-germées à l'obscurité pendant 24h sur une gaze stérile humidifiée avec environ 5 mL d'eau distillée. Ensuite, 6 graines pré-germées (le germe doit rester inférieur à 2 mm) sont disposées sur 60 g de sol dilué et arrosées avec 20 mL d'eau distillée. Les graines sont ensuite légèrement enfoncées dans le sol dilué. Les essais ainsi préparés sont ensuite disposés aléatoirement dans une enceinte contrôlée (KBWF 240 Binder®) pendant 4 jours selon les paramètres suivants : intensité lumineuse 3000 lux, photopériode de 16h, humidité relative 70%, température 20°C. A la fin de l'expérience, les plantules sont récoltées et lavées à l'eau distillée. La longueur de la racine la plus longue (l) est mesurée pour chaque plantule. Les moyennes sont calculées, puis comparées entre les différents microcosmes. La figure 17 illustre cette expérience.

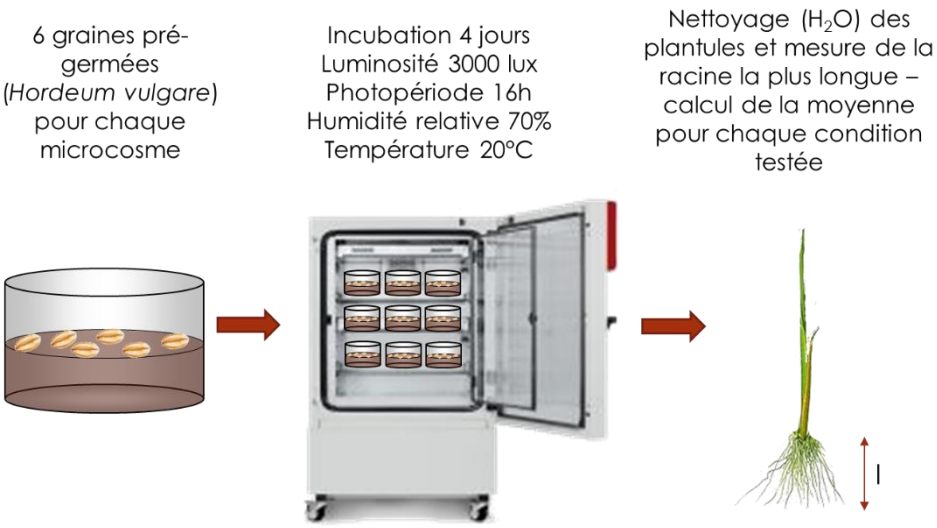


Figure 17 : déroulement du test de germination.

III. Analyse des éléments métalliques

III.1. Minéralisation acide

Une étape de solubilisation totale des matrices solides est nécessaire pour réaliser l'analyse élémentaire chimique. Le protocole est adapté de la norme NF EN 13656. Une prise d'essai de 0,2 g de la matrice à analyser est déposée dans une bombe en Teflon® étanche (les matrices doivent être préalablement séchées à l'air et broyées afin d'obtenir une fraction < 2mm) et 10 mL d'eau régale sont ajoutés [6,66 mL d'HCl (35%, qualité analytique, Carlo Erba®) et 3,33 mL d'HNO_3 (60%, qualité analytique, Carlo Erba®)]. L'ensemble est placé dans un minéralisateur micro-ondes permettant un chauffage sous pression (Berghof® SpeedWave MWS-2). Une fois revenu à température ambiante, le minéralisat est ramené à 50 mL (fiole jaugée) avec de l'eau ultra pure, filtré à 0,45 µm (Millipore®) et conservé dans un tube en polypropylène à 4°C avant analyse. Chaque échantillon est minéralisé en triplicat. Ce protocole de minéralisation a été validé par la minéralisation et l'analyse de matériaux certifiés (paragraphe III.3 page 93)

III.2. Extraction séquentielle

L'extraction séquentielle permet de définir la répartition des éléments métalliques au sein de différentes fractions minéralogiques du sol considéré (chapitre 1, paragraphe III.3, page 52). Plusieurs solutions extractantes de plus en plus agressives sont appliquées successivement sur la même prise d'essai de 1 g. Une étape de séchage sépare deux étapes d'extractions. La température de séchage ne doit pas dépasser 40°C afin de ne pas perdre les éléments volatils. La méthode appliquée (Leleyter et Probst 1999) permet d'obtenir la répartition des métaux selon 7 fractions minéralogiques déterminées de manière opérationnelle. Le tableau 14 présente le protocole détaillé de la méthode. Quatre réplicats sont réalisés par étape. Chaque lessivat est filtré (filtre HVLP, 0,45 µm) grâce à une pompe à vide, puis conservé à +4°C avant analyse par ICP-OES. Une acidification par 1 mL d'HNO_3 (60%, qualité analytique, Carlo Erba®) a parfois été nécessaire pour dissoudre des précipités néoformés après conservation à +4°C.

Tableau 14 : protocole de l'extraction séquentielle (d'après Leleyter et Probst 1999).

Fraction	Réactif	Durée de la phase d'extraction	Température	Densité du lessivat
F1 : soluble dans l'eau	Eau 10 mL	30 min	20°C	1,000
F2 : facilement échangeable	Nitrate de Magnésium 1 M 10 mL	2 h	20°C	1,085
F3. liée aux carbonates	Acétate de sodium 1 M 10 mL pH=4,5 (acide acétique)	5 h	20°C	1,027
F4a : liée aux oxydes de Mn	Chlorure d'hydroxylammonium 0,1 M 10 mL	30 min	20°C	1,002
F4b : liée aux oxydes de Fe amorphes	[Oxalate d'ammonium 0,2 M, acide oxalique 0,2 M] 10 mL	4 h à l'obscurité	20°C	1,018
F4c : liée aux oxydes de Fe cristallins	[Oxalate d'ammonium 0,2 M, acide oxalique 0,2 M, acide ascorbique 0,1 M] 10 mL	30 min	80°C	1,024
F5 : liée à la MO	1 - Ammoniac 0,02 M, 3 mL eau oxygénée 35%, 8 mL	5 h	85°C	1,057
	2- Acétate d'ammonium 3,2 M (20%v/v HNO_3), 5 mL	30 min	85°C	1,057

III.3. Spectrométrie d'émission atomique avec plasma couplé induit

L'ensemble des minéralisats et des extraits obtenus par les protocoles décrits aux paragraphes III.1 et III.2 de ce chapitre ont été analysés par ICP-OES (Inductively Coupled Plamsa Optical Emission Spectrometry, Agilent Technologies® 5100). Les étalonnages externes sont réalisés à partir de solutions standards PlasmaCal, dont les gammes de concentrations vont de 0 à 1000 $mg.L^{-1}$. Un total de 5 mesures est effectué pour chaque échantillon. Les limites de détection (LD) sont calculées par estimation de 3 fois l'écart-type de l'analyse de 10 blancs analytiques. Les limites de quantification (LQ) sont calculées par estimation de 10 fois l'écart-type de l'analyse de 10 blancs analytiques. Les valeurs obtenues sont données dans le tableau 15.

Tableau 15 : valeurs des Limites de Détection (LD) et des Limites de Quantification (LQ) pour les métaux dosés par ICP-OES.

Métal	LD $mg.L^{-1}$	LQ $mg.L^{-1}$
Cd	0,002	0,006
Cu	0,002	0,006
Pb	0,003	0,009
Ca	0,061	0,203
Cr	0,002	0,005
Fe	0,032	0,105
K	0,009	0,030
Mn	0,002	0,006
Ni	0,002	0,006
Zn	0,008	0,025

Les analyses effectuées sur les matrices "sols" et les matrices "champignons" ont été validées grâce à des matériaux de référence certifiés. Le sédiments HR-1 (sédiment estuarien, NWR® Institute) a été utilisé pour l'analyse des sols. Le matériau CSM-2 (poudre d'*Agaricus campestris*, LGC Standards®) a été utilisé pour valider l'analyse des champignons. Les données du tableau 16 indiquent que nos valeurs expérimentales sont conformes aux matériaux certifiés. Les intervalles de références de Cd et Pb sont inférieure aux limites de détections dans la matrice fongique. Nos protocoles (minéralisation et analyses) sont validés.

Pour chaque métal, les longueurs d'ondes les plus intenses et avec le moins d'interférence ont été sélectionnées pour les quantifications (tableau 16). Des oligo-éléments (Ca, Fe, K par exemple) et d'autres métaux présents et potentiellement toxiques (Ni) sont aussi dosés afin de comparer leurs répartitions au sein des fractions minéralogiques suite aux essais de biostimulation et de bioaugmentation.

Tableau 16 : longueurs d'onde utilisées pour doser les métaux et comparaison de la méthode analytique utilisée avec les matériaux certifiés de référence.

Métal	**Longueur d'onde** (nm)	**HR-1**		**CSM-2**	
		Intervalle de référence ($mg.kg^{-1}$)	Valeur dosée ($mg.kg^{-1}$)	Intervalle de référence ($mg.kg^{-1}$)	Valeur dosée ($mg.kg^{-1}$)
Cd	226,502	[3 ; 5]	5	[0,088 ; 0,096]	< LD
Cu	327,395	[79 ; 91]	79	[22,04 ; 23,76]	22,9
Pb	220,000	[102 ; 176]	137	[0,096 ; 0,126]	< LD
Ca	422,000	[28450 ; 106870]	47177	-	1304
Cr	283,563	[81 ; 171]	90	[1,09 ; 1,32]	1,3
Fe	238,000	[16230 ; 44930]	17959	-	131
K	766,000	[2036 ; 2130]	2077	-	40469
Mn	257,000	[466 ; 632]	481	-	7
Ni	230,299	[24 ; 54]	32	-	<LD
Zn	213,857	[932 ; 1278]	938	[41,27 ; 43,73]	42,8

Les concentrations données sont les concentrations totales pour les valeurs de référence et totales (minéralisation à l'eau régale) pour les valeurs dosées au cours de l'étude.
LD : Limite de Détection calculée pour la matrice fongique en fonction de la masse de la prise d'essai (0,2 g) et du volume du minéralisat (50 mL), soit 0,5 $mg.kg^{-1}$ pour Cd et Ni et 0,75 $mg.kg^{-1}$ pour Pb.
- : valeur non référencée

IV. Analyses statistiques

Toutes les variables aléatoires (biomasse, pH, pourcentage de biosorption du métal, concentration du métal biosorbé dans le mycélium) ont été décrites à partir de la moyenne, de l'écart-type, et de la médiane.

A l'issue des expériences en milieu liquide, la normalité des distributions a été évaluée avec un test de Shapiro-Wilk. La recherche de corrélations entre les différents paramètres (biomasse, pH, pourcentage de biosorption du métal, concentration du métal biosorbé dans le mycélium) a été effectuée en utilisant un test non paramétrique de corrélation de Spearman.

Les médianes obtenues pour chaque paramètre mesuré lors de l'étude préliminaire avec *Absidia cylindrospora* et lors du screening (biomasse, pH, pourcentage de biosorption du métal, concentration du métal biosorbé dans le mycélium) ont été comparées avec un test de Wilcoxon.

Les médianes obtenues pour les concentrations en métal au sein des spéciations minéralogiques et le test de germination (longueur des racines les plus longues) ont aussi été comparées avec un test de Wilcoxon.

Pour tous les tests, la signification statistique a été définie lorsque $p < 0,05$. Les analyses statistiques des résultats ont été réalisées à l'aide des logiciels SAS, version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) et R Studio, version 1.1.383 (R Core Team 2017).

Chapitre 3 :

Résultats et Discussion

I. Champignons isolés de sols et intégrés à l'étude

La méthode d'incorporation directe (chapitre 2, paragraphe I.1, page 72) et la méthode des suspensions-dilutions (chapitre 2, paragraphe I.2, page 73) ont permis de purifier et d'identifier 21 isolats fongiques qui ont été intégrés à l'étude de screening. Ces 21 espèces ont été isolées à partir de différents sols pollués d'origine industrielle par le Dr Lucile SAGE (Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR 5553 LECA, Université Grenoble Alpes). La mise en culture de fractions de sporophores (chapitre 2, paragraphe I.3, page 73) a également permis d'isoler 7 isolats de Basidiomycètes issus d'un sol forestier. La détermination taxonomique des espèces fongiques a été réalisée par étude morphologique et moléculaire (chapitre 2, paragraphe I.4, page 74). Les séquences ITS obtenues lors du séquençage sont mentionnées dans l'annexe III (page 209). Chaque séquence a été comparée aux bases de données BLAST (NCBI) et Mycobank (Robert et al. 2013) pour compléter les identifications morphologiques. Au total, 28 isolats fongiques ont été intégrés à l'étude de screening. Ils sont répartis en 8 ordres et 23 genres. Ces isolats comprennent 12 Ascomycètes, 15 Basidiomycètes et 1 Zygomycète. Le tableau 17 présente des données concernant le sol d'origine des isolats fongiques, leur appartenance taxonomique et les milieux de culture utilisés pour leur réactivation. La durée de pré-culture (à 25°C) nécessaire à l'obtention d'une biomasse recouvrant la surface d'une boîte de Petri de 90 mm est également précisée.

Tableau 17 : origine, taxonomie et conditions de culture des isolats fongiques intégrés à l'étude.

Origine des isolats et données de contamination des sols	Division Ordre	Famille	Espèces	Milieu de Culture	Durée de la pré-culture (jours)
Sol 1 : Industriel HAP 2061 mg.kg^{-1} Cd 12 mg.kg^{-1} Cu 135 mg.kg^{-1} Pb 999 mg.kg^{-1}	Mucoromycota Mucorales	*Cunninghamellaceae*	***Absidia cylindrospora***	MEA	**10**
Sol 2 : Forêt Cd = 1,4 mg.kg^{-1} Cu = 7,0 mg.kg^{-1} Pb = 3,9 mg.kg^{-1}	Basidiomycota Agaricales	*Agaricaceae*	***Agaricus arvensis***	PDA	**20**
		Agaricaceae	***Agaricus bisporus***	PDA	**20**
		Marasmiaceae	***Megacollybia platyphylla***	MEA	**20**
		Pleurotaceae	***Pleurotus ostreatus***	MEA	**10**
		Pleurotaceae	***Pleurotus pulmonarius***	MEA	**10**
	Basidiomycota Polyporales	*Polyporaceae*	***Fomes fomentarius***	MEA	**10**
		Fomitopsidaceae	***Laetiporus sulphureus***	MEA	**10**
Sol 3 : Industriel Cd < LD Cu 345 mg.kg^{-1} Pb 160 mg.kg^{-1}	Basidiomycota Agaricales	*Psathyrellaceae*	***Coprinellus xanthothrix***	MEA	**10**
	Ascomycota Sordariales	*Chaetomiaceae*	***Chaetomium atrobrunneum***	MEA	**20**
		Chaetomiaceae	***Chaetomium gracile***	MEA	**20**
		Chaetomiaceae	***Humicola fuscoatra***	MEA	**20**
		Sordariaceae	***Sordaria lappae***	MEA	**10**
Sol 4 : Industriel Cd < LD Cu 100 mg.kg^{-1} Pb 140 mg.kg^{-1}	Basidiomycota Agaricales	*Psathyrellaceae*	***Coprinellus micaceus***	MEA	**10**
	Ascomycota Eurotiales	*Trichocomaceae*	***Penicillium oxalicum***	MEA	**20**
	Ascomycota Hypocreales	Not assigned	***Emericellopsis minima***	PDA	**20**

Origine des isolats et données de contamination des sols	Division Ordre	Famille	Espèces	Milieu de Culture	Durée de la pré-culture (jours)
Sol 4 : Industriel Cd < LD Cu 100 mg.kg^{-1} Pb 140 mg.kg^{-1}	Ascomycota Microascales	*Microascaceae*	***Petriella sp***	MEA	**20**
	Basidiomycota Polyporales	*Ganodermataceae*	***Ganoderma resinaceum***	MEA	**10**
		Polyporaceae	***Perenniporia fraxinea***	PDA	**20**
	Ascomycota Sordariales	*Chaetomiaceae*	***Humicola sp***	MEA	**10**
	Ascomycota	*Pseudeurotiaceae*	***Pseudeurotium bakeri***	MEA	**20**
Sol 5 : Industriel PCB > 8000 mg.kg^{-1}	Basidiomycota Agaricales	*Psathyrellaceae*	***Psathyrella candolleana***	MEA	**10**
		Schizophyllaceae	***Schizophyllum commune***	MEA	**10**
	Basidiomycota Polyporales	*Phanerochaetaceae*	***Irpex lacteus***	MEA	**10**
		Non déterminé	***Phaeophlebiopsis peniophoroides***	MEA	**10**
	Ascomycota Xylariales	*Xylariaceae*	***Xylaria sp***	MEA	**20**
Sol 6 : Industriel Cu 2 mM	Ascomycota Coniochaetale	*Coniochaetaceae*	***Coniochaeta hoffmannii***	MEA	**20**
	Ascomycota Hypocreales	*Nectriaceae*	***Fusarium oxysporum***	PDA	**10**

MEA : Malt Extract Agar
PDA : Potato Dextrose Agar
LD : Limite de Détection

Les contaminants organiques des sols 1 et 5, ainsi que la concentration en cuivre du sol 6 ont été déterminées par le LECA (données non publiées). Les concentrations totales en éléments métalliques des sols 1, 2, 3 et 4 ont été mesurées, après minéralisation acide à l'eau régale (chapitre 2, paragraphe III.1, page 91), par ICP-OES (chapitre 2, paragraphe III.3, page 93).

Le sol 1 dont est issue *Absidia cylindrospora* (souche avec laquelle les expériences ont été développées) présente des concentrations élevées en Cd (12 mg.kg^{-1}), Cu (135 mg.kg^{-1}) et Pb (999

mg.kg^{-1}), ainsi qu'une pollution par les HAP (2061 mg.kg^{-1}). Selon le tableau 4 (page 38), ces valeurs constituent des anomalies fortes. Le contexte du prélèvement (sol industriel) associé à ces concentrations élevées sont deux arguments forts en faveur d'une pollution de ce sol par ces éléments. La même interprétation est possible pour les sols 3 et 4. Tous deux ont été prélevés dans un contexte d'activité industrielle et présentent des concentrations supérieures à celles indiquées par Baize et al. (2004) en ce qui concerne Cu et Pb (respectivement 345 mg.kg^{-1} et 160 mg.kg^{-1} pour le sol 3 ; ainsi que 100 mg.kg^{-1} et 140 mg.kg^{-1} pour le sol 4). Pour ces 2 sols en revanche, la concentration en Cd des minéralisâts est inférieure à la limite de détection (LD = 0,002 mg.L^{-1}, chapitre 2, paragraphe III.3, page 93). Pour le sol forestier, on remarque que Cu et Pb sont présents à des concentrations (respectivement 7,0 et 3,9 mg.kg^{-1}) inférieures aux valeurs rapportées par Baize et al. (2007) et sont donc dans la gamme courante du tableau 4, contrairement à Cd (1,4 mg.kg^{-1}), qui constitue une anomalie. Cette valeur est cependant inférieure au seuil légal de l'arrêté du 8 janvier 1998 qui est de 2,0 mg.kg^{-1} pour Cd concernant l'épandage de boues sur des sols agricoles. Cette valeur est en accord avec les résultats obtenus par Saussaye (2012) et Baraud et Leleyter (2012) (chapitre 1, paragraphe II.2, page 40). Cette concentration peut donc être interprétée comme une valeur forte mais pas nécessairement comme le signe d'une contamination. Des expériences complémentaires pourraient permettre d'approfondir cette interprétation : facteur d'enrichissement, évaluation de la disponibilité environnementale (Baraud et al. 2017). La flore fongique isolée à partir des sols industriels est donc une microfonge de sols contaminés (sols 1, 3, 4, 5 et 6) alors que les Basidiomycètes issus du sol forestier sont issus d'un sol non pollué (sol 2).

Les espèces isolées des sols pollués appartiennent majoritairement aux Ascomycètes (15 isolats sur 20). L'étude de Bourceret et al. (2016) indique que les populations fongiques des sols pollués sont dominées par ce groupe. Au niveau mondial, les sols semblent plutôt dominés par les Agaricomycètes (classe monophylétique des Basidiomycètes) selon Tedersoo et al. (2014). Les études concernant la biodiversité fongique de tels sols contaminés sont peu nombreuses. Certains auteurs indiquent que la pollution (organique et/ou inorganique) diminue la biodiversité fongique des sols (Evdokimova and Korneykova 2010; Thion et al. 2012). Thion et al. (2012) précisent que le fait de maintenir un couvert végétal sur des sols pollués améliore cette biodiversité fongique. D'après Op De Beeck et al. (2015), les teneurs en Zn et Cd sont corrélées à la composition de la communauté fongique mais aucun effet n'est

observé sur la diversité des espèces. La richesse et la complexité du monde fongique semblent difficile à interpréter dans ce contexte particulier des sols pollués (Dighton 2003). Des études concernant la diversité des populations fongiques mycorhiziennes, souvent réalisées dans un contexte de phytoremédiation assistée, ont aussi montré l'influence des polluants métalliques sur ces populations de champignons particuliers (Zarei et al. 2010; Hassan et al. 2013). Dans ce cas, la pollution métallique a plutôt tendance à diminuer la colonisation des racines et la diversité des espèces fongiques.

Les genres *Chaetomium, Cladosporium, Collybia, Coniochaeta, Fusarium, Mucor, Penicillium* et *Sordaria* ont déjà été isolés à partir de sols pollués dans d'autres études (Thion et al. 2012; Zotti et al. 2014; Bourceret et al. 2016; Borowik et al. 2017; Chanda et al. 2017). Cependant, ces genres sont aussi des genres habituels de la flore fongique du sol en général (Domsch et al. 1995; Watanabe 2002). Les genres *Alternaria, Aspergillus, Cunninghamella, Geomyces, Geotrichum, Neurospora, Rhizopus, Monilia* et *Trichoderma,* genres cités fréquemment dans les sols contaminés par les métaux ne sont pas retrouvés dans notre étude (Domsch et al. 1995; Watanabe 2002; Thion et al. 2012; Bourceret et al. 2016; Henderson et al. 2017; Chanda et al. 2017). Nous pouvons en revanche remarquer les espèces *Chaetomium gracile* et *Humicola fuscoatra*, qui sont considérées comme thermophiles, et sont donc également adaptées à un stress.

Certaines études montrent que la pollution, apparentée à un environnement extrême, sélectionne certains taxons, dont certains peuvent être considérés comme des extrêmophiles. Cela a pour conséquence de diminuer la diversité (nombre d'espèces différentes, ou richesse spécifique) et de favoriser la représentativité des espèces sélectionnées par ces conditions (abondance relative). En résumé, la pollution sélectionne des espèces plus tolérantes, ou adaptées, qui vont dominer la communauté fongique (Bills et al. 2004; Lodge et al. 2004; Zafar et al. 2007; Op De Beeck et al. 2015; Money 2016; Henderson et al. 2017). Cependant, les conséquences sont variables selon les types de pollution. En effet, selon Henderson et al. (2015), Cu semble avoir plus d'impact sur la diversité des espèces (en sélectionnant des genres comme *Fusarium* et *Trichoderma*) que Cd et Pb. De plus, selon Henderson et al. (2017), les conclusions de 8 études divergent quant au rôle de sélection des contaminations métalliques. Par exemple, la contamination par Pb, Zn et Cd ne semble pas influencer les communautés fongiques d'un sol chinois, alors qu'un effet est noté (pour Zn et Cd) dans des sols

belges (Henderson et al. 2017 ; Op de Beck et al. 2015). Concernant Cu, il semble qu'il puisse occasionner des modifications de structure dans les communautés fongiques en fonction de la dose, très certainement en sélectionnant les espèces de plus en plus adaptées. Les auteurs notent que ces modifications peuvent aussi être liées aux changements globaux qui engendrent, entre autres, une fructification plus précoce dans l'année et des modifications des paramètres du sol et de la biologie des sols en général qui sont des facteurs de sélection des espèces. Les auteurs mentionnent aussi le fait que selon les études, l'influence de la pollution métallique diminue la diversité des espèces (avec un impact sur la structure des communautés fongiques) ou diminue uniquement l'abondance des espèces (mais cette fois sans modifier la structure des communautés fongiques).

La plupart des études se concentrent principalement sur les espèces fongiques mycorhiziennes, en lien avec des populations végétales, et ne donnent donc pas un aperçu global des populations fongiques. Or les espèces fongiques mycorhiziennes sont aussi très liées aux structures des populations végétales et donc aux paramètres biogéographiques. De plus, ces études sont basées sur l'analyse moléculaire des communautés fongiques et s'appuient sur des banques de données qui sont largement incomplètes. Il existe donc un biais potentiellement important sur ces analyses de populations (Hinrikson et al. 2005 ; Op de Beck et al. 2014 ; Nam et al. 2015 ; Stielow et al. 2015).

Ces différentes considérations illustrent la richesse des communautés fongiques et la complexité des relations entre ces communautés et leurs habitats.

II. Etude des interactions entre les isolats fongiques et les métaux

Ce paragraphe présente les résultats des expériences de tolérance aux métaux (Cd, Cu et Pb) en milieu gélosé pour *Absidia cylindrospora* (chapitre 3, paragraphe II.1.1, ci-dessous) puis pour les 28 isolats de l'étude (chapitre 3, paragraphe II.1.2, page 107). Il est suivi d'un volet concernant l'expérience de biosorption en milieu liquide (chapitre 3, paragraphe II.2, page 121). Pour cette expérience, les résultats de l'étude préliminaires avec *Absidia cylindrospora* sont d'abord présentés et discutés. Cette étude préliminaire a permis de sélectionner les paramètres d'exposition pour l'étude de screening (dose et temps d'exposition) dont les résultats sont présentés pour les 28 souches fongiques testées. Ce screening a permis de sélectionner 3 isolats qui ont ensuite été utilisés pour les études en microcosmes de sol (chapitre 3, paragraphe II.3, page 152).

II.1. Essais de tolérance en milieu gélosé

De façon générale, les isolats fongiques saturent une boîte de Petri en 7 jours en l'absence de métal (pour les plus rapides comme *Absidia cylindrospora, Ganoderma resinaceum*) jusqu' à plus de 30 jours (pour les espèces à croissance plus lente comme *Agaricus arvensis* et *Agaricus bisporus*).

Les éléments principaux concernant la tolérance des 28 isolats vis-à-vis des 3 métaux étudiés (Cd, Cu et Pb) sont mentionnés dans cette partie. Le tableau 18 résume les concentrations maximales tolérées par les 28 isolats. Une analyse plus détaillée est proposée pour *Absidia cylindrospora* (notre micromycète modèle) et pour 3 Basidiomycètes (*Agaricus bisporus, Coprinellus micaceus, Ganoderma resinaceum*) permettant ainsi d'illustrer la diversité des profils. Les profils de tolérance des 28 isolats sont présentés dans l'annexe IV (page 213).

Une dose de métal est considérée comme tolérée lorsqu'elle permet une croissance fongique, même si celle-ci est ralentie ou diminuée par rapport au témoin. L'effet d'une dose de métal est considéré comme fongistatique lorsque cette dose inhibe la croissance fongique mais que le transfert du mycélium inhibé sur un nouveau milieu sans métal permet au mycélium de se développer à nouveau. L'effet est

fongicide lorsque ce même transfert ne permet plus la croissance du mycélium (Jullien and Gozalo 2018).

II.1.1. Tolérance d'*Absidia cylindrospora* vis-à-vis de Cd, Cu et Pb.

Comme le montre la figure 18, *Absidia cylindrospora* tolère différemment les 3 métaux de l'étude. En effet, cet isolat est capable de tolérer 1000 mg.L^{-1} de Cd (figure 18A□), 50 mg.L^{-1} de Cu (figure 18BΔ) et 100 mg.L^{-1} de Pb (figure 18C○). La figure 19 montre le mycélium d'*A. cylindrospora* en condition optimale (sans stress métallique, figure 19A) et en condition de stress métalliques par Cd (figure 19B), Cu (figure 19C) et Pb (figure 19D).

Cd est seulement capable de ralentir la croissance de cet isolat, qui n'arrive plus, à la dose de 1000 mg.L^{-1}, à saturer une boîte de Petri après 30 jours de croissance alors que le témoin sans métal y parvient en 7 jours (figure 18A). Hormis une croissance ralentie, le mycélium montre peu de perturbation morphologique par rapport au témoin (figure 19A et 19B). Cd est donc bien toléré par cet isolat sur milieu gélosé.

La dose de 100 mg.L^{-1} de Cu est fongistatique pour ce champignon. En effet, le mycélium inhibé et transféré sur un nouveau milieu sans métal reprend une croissance à une vitesse proche de celle du témoin. Ce métal devient en revanche fongicide à la dose de 1000 mg.L^{-1} (figure 18B□). Des perturbations morphologiques importantes apparaissent dès la dose de 50 mg.L^{-1} (figure 19C). Le mycélium devient intra-matricale, en développant peu de filaments et en formant une "croûte" à la surface de la gélose.

Pb est relativement bien toléré jusqu'à la dose de 100 mg.L^{-1} et permet au mycélium de saturer la boîte de Petri en 30 jours. En revanche, la dose de 1000 mg.L^{-1} est fongistatique (figure 18C□). Pb est donc lui aussi bien toléré par cet isolat, même si des perturbations morphologiques apparaissent dès 50 mg.L^{-1} (figure 19D). Soumis à Pb, le mycélium est moins dense que le témoin, et il semblerait que le mycélium ait sporulé, conduisant à la formation de zones de croissance secondaires.

Absidia cylindrospora est issu d'un sol pollué par Cd, Cu et Pb. Il apparaît que cet isolat tolère les 3 métaux de l'étude, même si des différences sont notables. Cd est le mieux toléré des 3 métaux par cet isolat, suivi par Pb et Cu. Il est possible que cet isolat se soit adapté à la présence de ces toxiques au sein

de son environnement. Des mécanismes de tolérance intrinsèques peuvent exister, mais les fortes concentrations tolérées font plutôt penser à des mécanismes induits (Chen et al. 2017; Mohammadian et al. 2017), ce qui semble cohérent avec les doses de métal élevées retrouvées dans son sol d'origine et qui ont pu promouvoir l'acclimatation de cet isolat à ces toxiques (tableau 17, page 99).

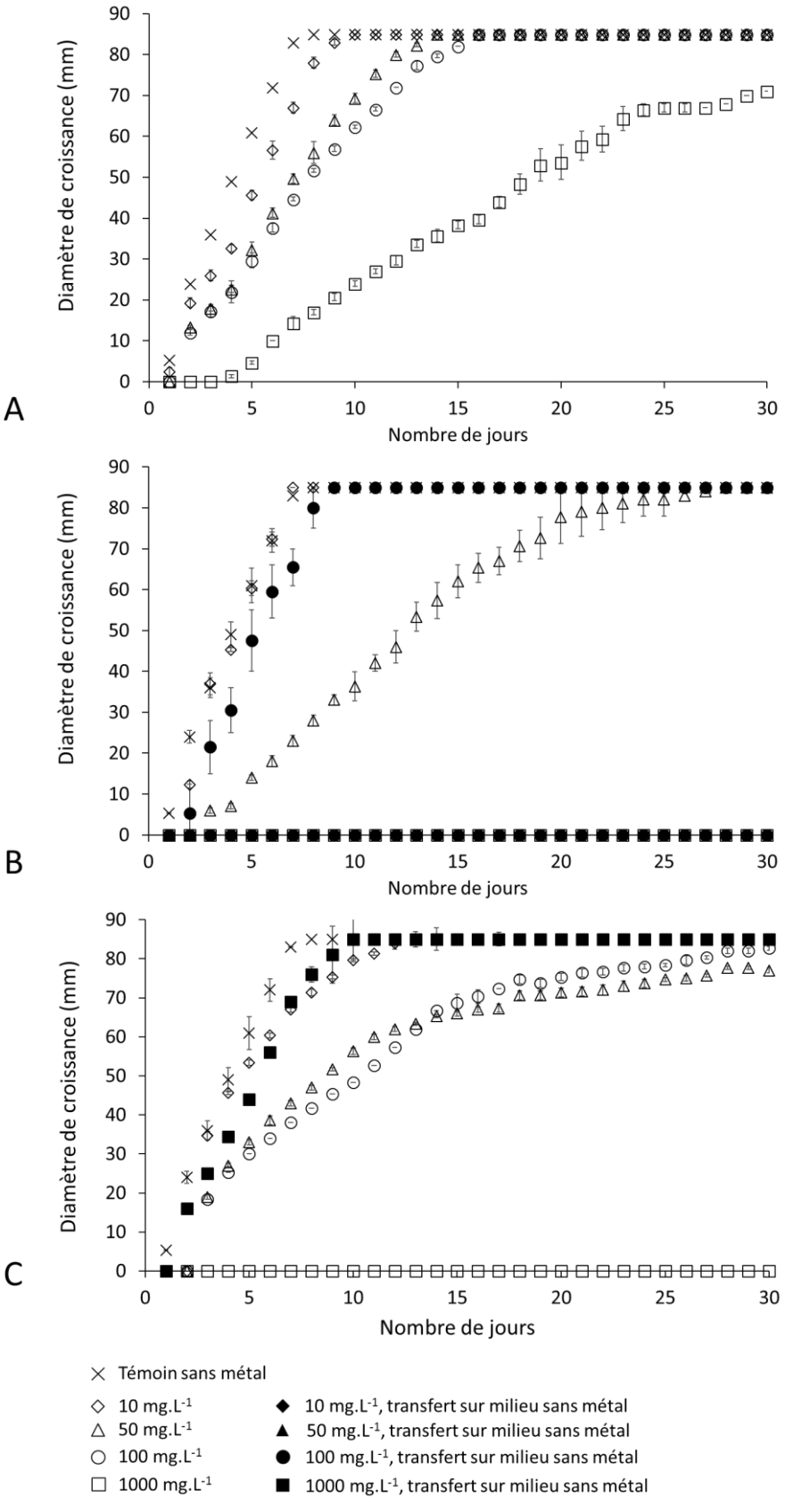


Figure 18 : profils de tolérance d'Absidia cylindrospora en milieu gélosé (MEA) enrichi en Cd (A), Cu (B) et Pb (C).

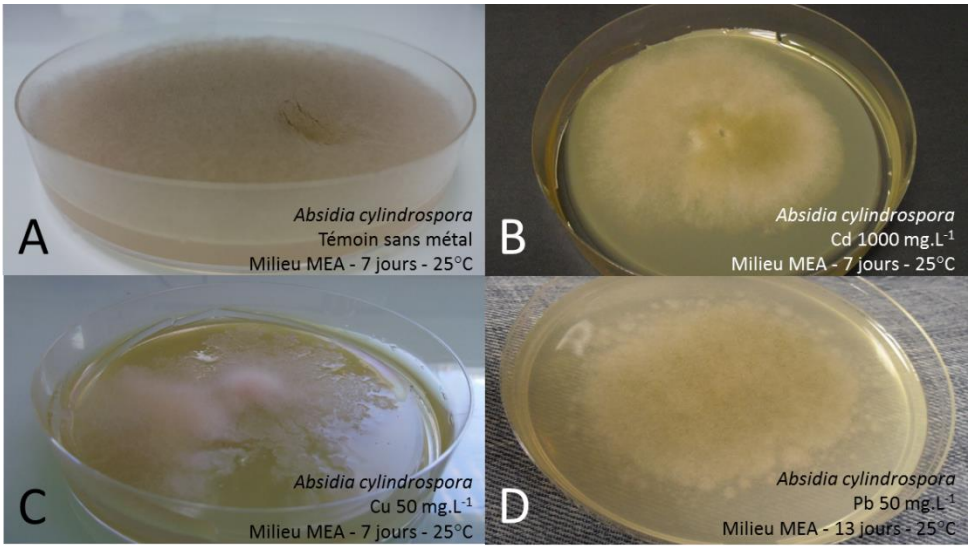


Figure 19 : exemples de mycéliums d'A. cylindrospora en condition optimale de croissance (A) et soumis à des conditions de stress métalliques par Cd (B), Cu (C) et Pb (D). Des perturbations morphologiques sont visibles. Les filaments mycéliens sont moins nombreux, moins aériens et moins denses (Source : ToxEMAC, Albert).

II.1.2. Tolérance des 28 isolats de l'étude vis-à-vis de Cd, Cu et Pb.

Le tableau 18 présente les valeurs maximales tolérées, en milieu gélosé, par les 28 isolats de l'étude et pour chaque métal. Aucun lien ne semble se dessiner entre l'appartenance taxonomique et la tolérance aux métaux, ce qui est en accord avec l'étude de Trevors et al. (1986). Peu d'études récentes ont étudié la tolérance aux métaux de groupes diversifiés de champignons comme dans notre étude.

Le tableau 19 présente, par groupe taxonomique, pour chaque métal, le nombre d'isolats tolérant chaque dose, répartis selon la taxonomie des groupes. L'ensemble des profils de tolérance à Cd, Cu et Pb des 28 isolats sont présentés dans l'annexe IV (figures 38 à 63, page 213 et suivantes).

Tableau 18 : concentrations maximales de Cd, Cu et Pb tolérées en milieu gélosé (MEA) par les 28 isolats de l'étude.

Sols	Isolats	Métal :		
		Cd	**Cu**	**Pb**
		CMT ($mg.L^{-1}$)	**CMT ($mg.L^{-1}$)**	**CMT ($mg.L^{-1}$)**
1	***Absidia cylindrospora***	**1000**	50	10
2	***Agaricus arvensis***	100	100	**1000**
	Agaricus bisporus	100	100	**1000**
	Fomes fomentarius	50	50	100
	Laetiporus sulphureus	10	100	**1000**
	Megacollybia platyphylla	0	10	100
	Pleurotus ostreatus	10	10	10
	Pleurotus pulmonarius	10	50	10
3	***Chaetomium atrobrunneum***	100	10	100
	Chaetomium gracile	100	50	10
	Coprinellus xanthothrix	100	10	100
	Humicola fuscoatra	100	100	**1000**
	Sordaria lappae	100	10	100
4	***Coprinellus micaceus***	100	10	100
	Emericellopsis minima	100	100	100
	Ganoderma resinaceum	100	50	100
	Humicola sp	100	100	100
	Penicillium oxalicum	50	100	**1000**
	Perenniporia fraxinea	10	100	**1000**
	Petriella sp	100	10	100
	Pseudeurotium bakeri	100	100	100
5	***Irpex lacteus***	50	10	**1000**
	Phaeophlebiopsis peniophoroides	50	100	100
	Psathyrella candolleana	100	10	100
	Schizophyllum commune	50	50	100
	Xylaria sp	100	100	50
6	***Coniochaeta hoffmannii***	100	100	**1000**
	Fusarium oxysporum	100	**1000**	**1000**

CMT : Concentration maximale tolérée ($mg.L^{-1}$).
Les valeurs en gras sont les concentrations tolérées les plus élevées pour chaque métal parmi ces espèces.

Tableau 19 : répartition des isolats fongiques en fonction de leur tolérance aux métaux.

Métal	Dose tolérée ($mg.L^{-1}$)	Nombre d'isolats testés			
		Zygomycètes	Ascomycètes	Basidiomycètes	Total
Cd	10	-	-	4	4
	50	-	1	4	5
	100	-	11	6	17
	1000	1	-	-	1
	Total	**1**	**12**	**14***	**27***
Cu	10	-	3	6	9
	50	1	1	4	6
	100	-	7	5	12
	1000	-	1	-	1
	Total	**1**	**12**	**15**	**28**
Pb	10	1	1	2	4
	50	-	1	-	1
	100	-	6	8	14
	1000	-	4	5	9
	Total	**1**	**12**	**15**	**28**

*Cd est fongicide dès la dose de 10 $mg.L^{-1}$ pour l'espèce *Megacollybia platyphylla*, le total est donc diminué de 1 pour ce métal.

Cas du cadmium

La souche *A. cylindrospora* est le seul isolat capable de tolérer jusqu'à 1000 mg.L^{-1} de Cd (figure 18A et tableau 18) et provient aussi du sol le plus chargé en Cd (tableau 17, page 99). Presque tous les Ascomycètes de l'étude le tolèrent à hauteur de 100 mg.L^{-1} (11/12) et 5 d'entre eux appartiennent à l'ordre des Sordariales (tableau 18). Seulement la moitié des Basidiomycètes (6/15) tolère 100 mg.L^{-1} de Cd (5 Agaricales et 1 Polyporales). Au total, 18 isolats sur les 28 testés tolèrent au moins 100 mg.L^{1} de Cd en milieu gélosé.

La figure 20 illustre la diversité des profils obtenus et montre que la dose de 100 mg.L^{-1} est fongicide pour *Agaricus bisporus* (figure 20A●), alors que *Coprinellus micaceus* tolère cette dose (figure 20B○). La dose de 1000 mg.L^{-1} devient cependant fongicide pour cet isolat (figure 20B■). Enfin, pour *Ganoderma resinaceum*, la dose de 1000 mg.L^{-1} est seulement fongistatique (figure 20C■). Chez de nombreux isolats, des perturbations morphologiques sont observées suite au stress induit par Cd. Des exemples sont donnés par la figure 21. Les mycéliums sont souvent moins denses, avec des filaments erratiques. Une dépigmentation, ou une pigmentation différente, est parfois présente, comme chez *Chaetomium atrobrunneum* (figure 21C et 21E) ou *Humicola sp* (figure 21G et 21H). Le mycélium de *Perenniporia fraxinea* développe peu de biomasse dans ces conditions, comparativement au témoin (figure 21E et 21F). De plus, le mycélium prend une forme ramifiée dont les filaments apparaissent épais, évoquant un mycélium exploratoire en quête d'une zone de croissance plus favorable (Deacon 2010).

Le Cd, métal toxique à faible dose et cancérigène chez les mammifères dont l'Homme, est donc relativement bien toléré par la plupart des 28 isolats de l'étude, même si des perturbations morphologiques sont retrouvées fréquemment. Des études plus approfondies permettrait d'étudier les structures membranaires des mycéliums morphologiquement perturbés afin de préciser les altérations mises en évidences. Ces altérations peuvent potentiellement être un frein aux mécanismes de sorption. Il est donc important de sélectionner des souches tolérantes avec un minimum de perturbations à ce niveau. Selon ces considérations, *A. cylindrospora* montre le meilleur potentiel envers Cd (tolérance à haute dose et peu de perturbations morphologiques).

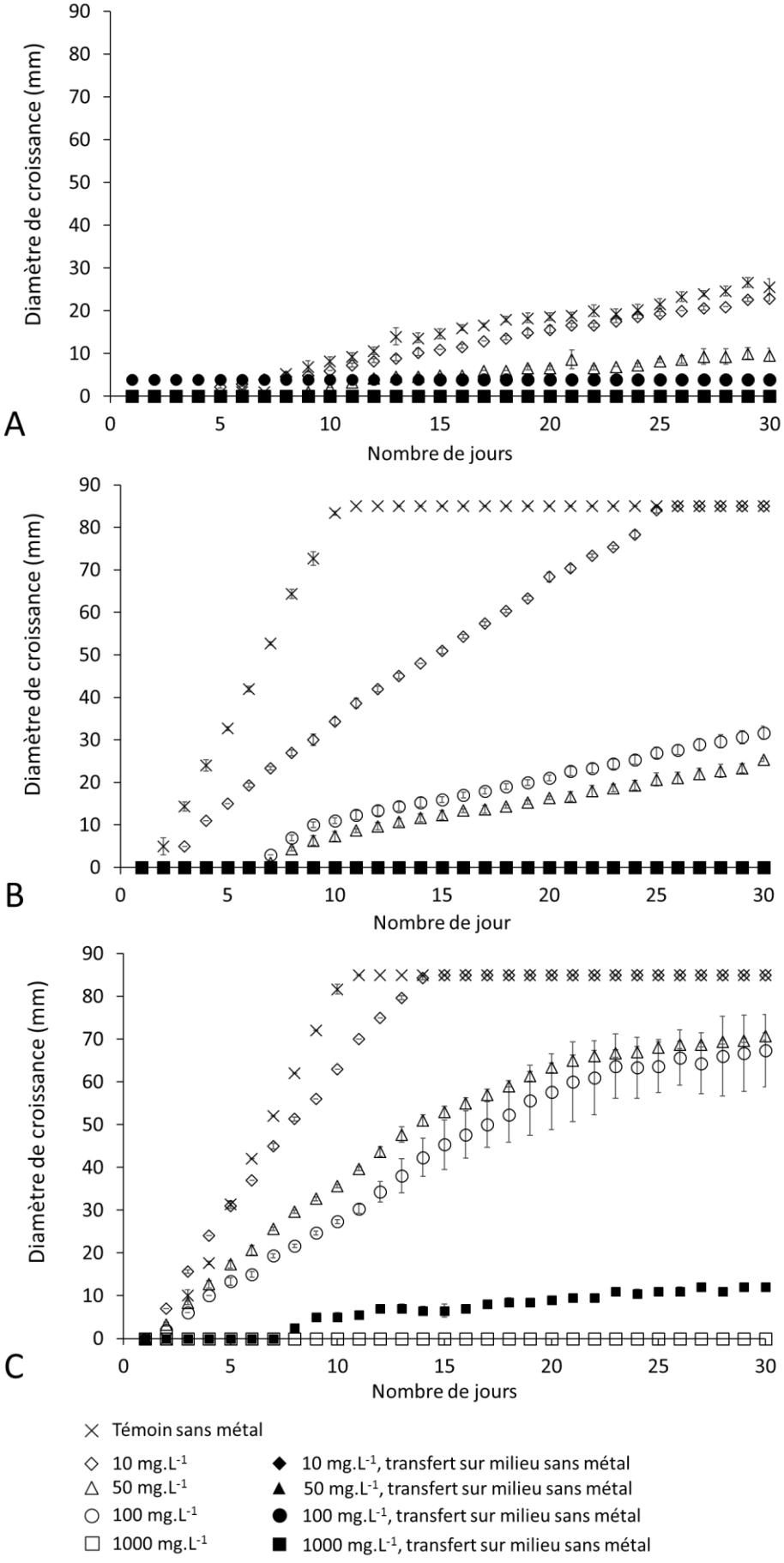


Figure 20 : exemples de profils de tolérance au Cd de 3 isolats fongiques de notre étude : Agaricus bisporus (A), Coprinellus micaceus (B) et Ganoderma resinaceum (C).

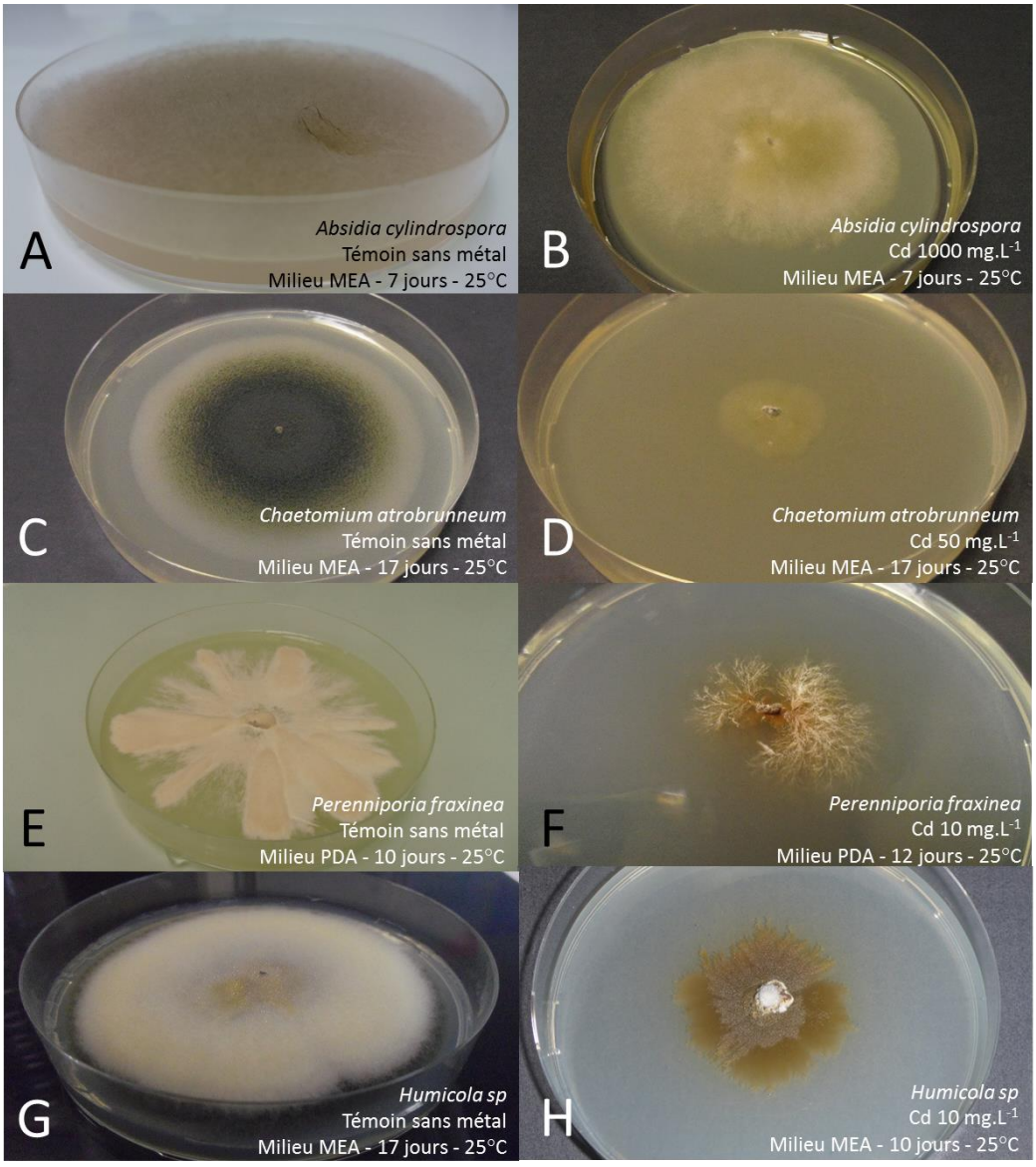


Figure 21 : exemples de modifications morphologiques engendrées par différentes concentrations de Cd en milieu gélosé, chez 4 isolats de l'étude : Absidia cylindrospora [témoin sans métal (A) et Cd 1000 mg.L^{-1} (B)] ; Chaetomium atrobrunneum [témoin (C) et Cd 50 mg.L^{-1} (D)] ; Perenniporia fraxinea [témoin (E) et Cd 10 mg.L^{-1} (F)] et Humicola sp [témoin (G) et Cd 10 mg.L^{-1} (H)].

Cas du cuivre

Fusarium oxysporum est le seul isolat capable de tolérer 1000 mg.L^{-1} de Cu (tableau 18). Un total de 7 Ascomycètes et 5 Basidiomycètes tolère Cu jusqu'à 100 mg.L^{-1} (tableau 19). Les exemples donnés par la figure 22 illustrent la diversité des profils de tolérance obtenus pour 3 Basidiomycètes. Dans ce cas, la dose de 100 mg.L^{-1} est bien tolérée par *Agaricus bisporus* (figure 22A○) puisqu'à cette dose, cet isolat croît comme le témoin. Cette même dose est tolérée mais ralentit fortement la croissance pour *Coprinellus micaceus* (figure 22B○). Pour ces deux isolats, la dose de 1000 mg.L^{-1} est fongicide. Pour *Ganoderma resinaceum*, les deux doses de 100 et 1000 mg.L^{-1} sont uniquement fongistatiques (figure 22C● et ■).

La figure 23 illustre les perturbations morphologiques engendrées pour certains isolats confrontés à Cu. Leur mycélium devient intramatrical (comme avec Cd), ne formant plus que des "croûtes" sur la gélose, avec quelques filaments éparses (figure 23A à 23H). Une dépigmentation est aussi visible sur ces exemples. Le caractère antifongique du Cu semble bien s'exprimer ici. Si on compare avec Cd, *A. bisporus* tolère mieux Cu que Cd (100 mg.L^{-1} pour Cu et 50 mg.L^{-1} pour Cd) alors que *C. micaceus* et *G. resinaceum* tolèrent mieux Cd que Cu (respectivement 10 et 50 mg.L^{-1} pour Cu et 50 et 100 mg.L^{-1} pour Cd).

Dans presque tous les cas, les isolats issus de sols pollués tolèrent mieux Cd que Cu (tableau 18) malgré les concentrations élevées en Cu dans les sols d'origine (tableau 17). En revanche, les isolats issus du sol forestier (considéré comme non contaminé) tolèrent souvent Cu aussi bien que Cd.

Aucun isolat ne semble vraiment bien adapté à Cu, hormis *F. oxysporum*. Selon Domsch (1980), ce métal pourrait même promouvoir la croissance de ce micromycète même si cela n'a pas été observé ici (annexe IV, figure 48, page 225). Cette espèce est fréquemment impliquée en phytopathologie en étant responsable de fusariose sur différents végétaux et en pouvant produire des mycotoxines (Domsch, 1980 ; Johnson, 2013). Son usage en mycoremédiation ne semble donc pas opportun car il pourrait permettre la diffusion et la propagation de maladies fongiques. On note en revanche, dans notre étude, sa résistance à cet antifongique très utilisé en agriculture.

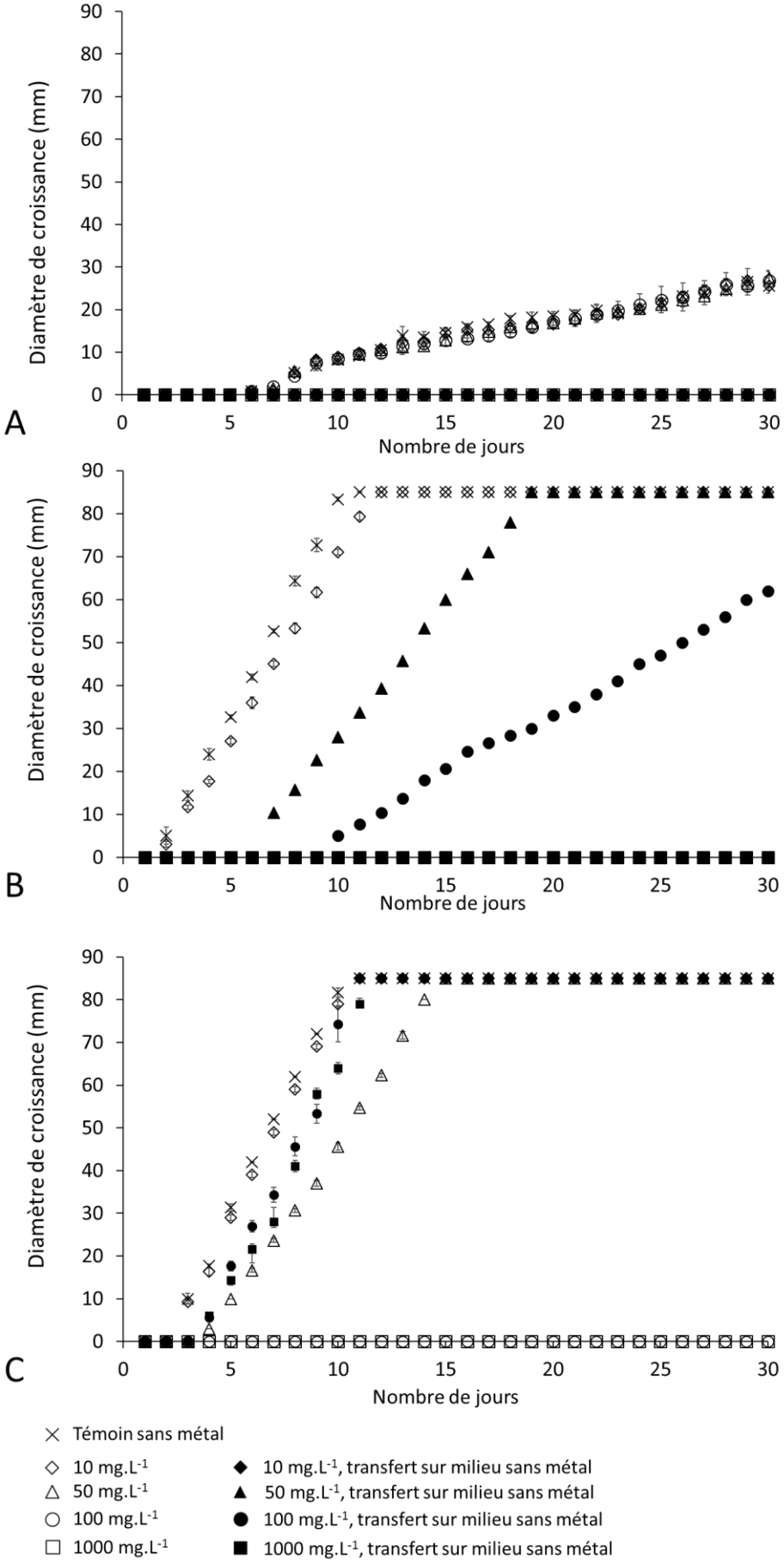


Figure 22 : exemples de profils de tolérance au Cu de 3 isolats de notre étude : Agaricus bisporus (A), Coprinellus micaceus (B) et Ganoderma resinaceum (C).

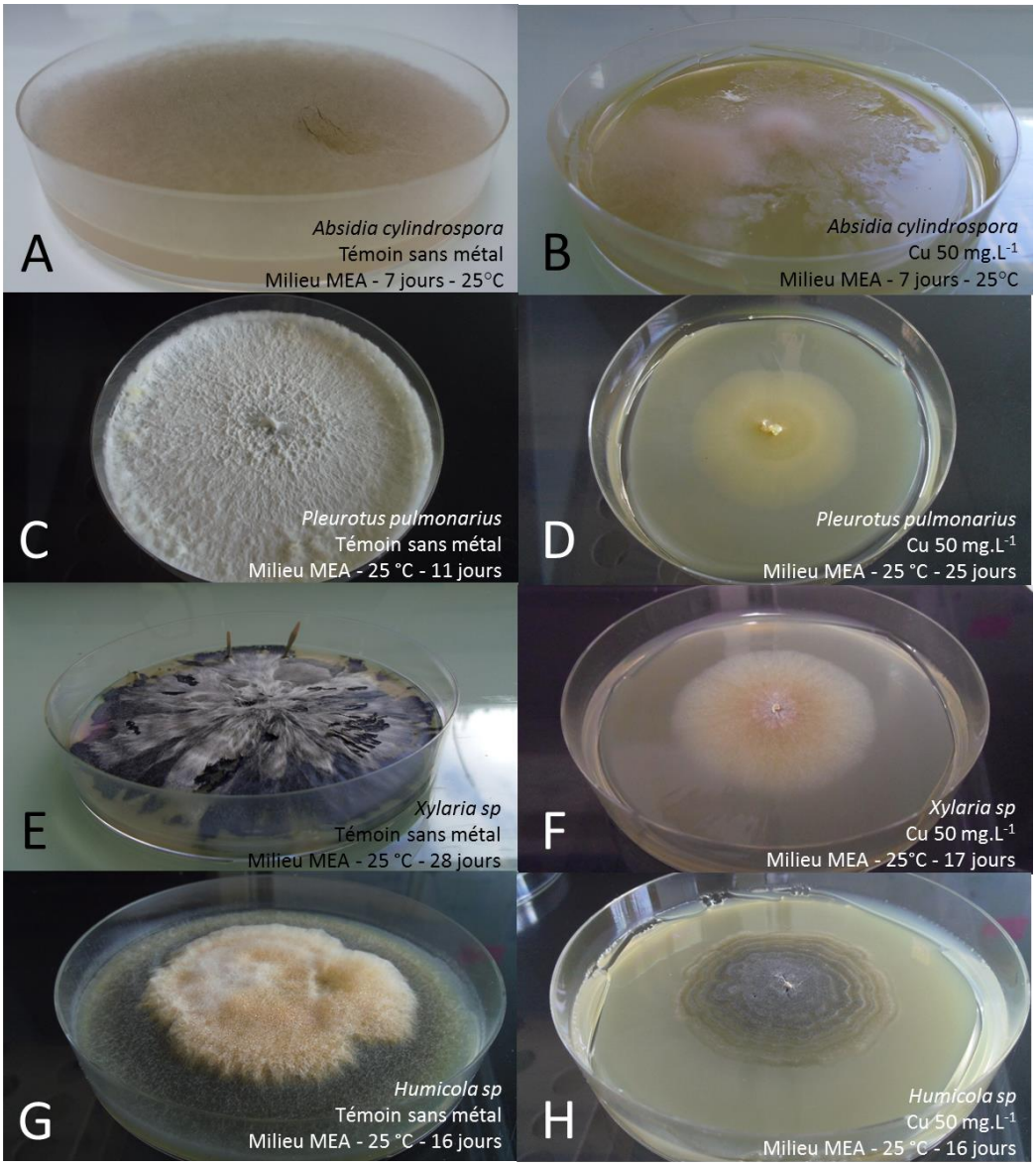


Figure 23 : exemples de modifications morphologiques engendrées par différentes concentrations de Cu en milieu gélosé, chez 4 isolats de l'étude : Absidia cylindrospora [témoin sans métal (A) et Cu 50 mg.L^{-1} (B)] ; Pleurotus pulmonarius [témoin (C) et Cu 50 mg.L^{-1} (D)] ; Xylaria sp [témoin (E) et Cd 50 mg.L^{-1} (F)] et Humicola sp [témoin (G) et Cu 50 mg.L^{-}1(H)].

Cas du plomb

Pb est relativement bien toléré par la plupart des souches. En effet, le tableau 19 montre que 9 isolats le tolèrent jusqu'à 1000 mg.L^{-1} (4 Ascomycètes et 5 Basidiomycètes), 14 isolats le tolèrent jusqu'à 100 mg.L^{-1} (6 Ascomycètes et 8 Basidiomycètes). Au total, 23 des 28 isolats tolèrent au moins 100 mg.L^{-1}. Des exemples de profils de tolérance sont donnés par la figure 24. Cette fois encore, les profils sont variés. Par exemple, la dose de 1000 mg.L^{-1} est tolérée et ne fait que ralentir la croissance d'*Agaricus bisporus* (figure 24A□) de moitié environ. Cette même dose devient fongicide pour *Coprinellus micaceus* (figure 24B■) alors qu'elle n'est que fongistatique pour *Ganoderma resinaceum* (figure 24C■).

Parmi les 9 isolats tolérants 1000 mg.L^{-1}, on retrouve *Agaricus arvensis* et *A. bisporus, Laetiporus sulphureus, Humicola fuscoatra, Perenniporia fraxinea, Irpex lacteus, Coniochaeta hoffmanii* et *F. oxysporum*. Les deux isolats d'*Agaricus*, ainsi que les isolats de *C. hoffmanii* et *P. oxalicum* ont des croissances lentes. Même sans stress métallique, ils ne saturent pas une boîte de Petri après 30 jours (figure 23A et annexe IV, page 213 - figures 39, 40, 43 et 55). Les autres isolats (*H. fuscoatra, I. lacteus, L. sulphureus, P. fraxinea)*, saturent une boîte de Petri pour des doses jusqu'à 100 mg.L^{-1} (annexe IV, page 213 - figures 50, 52, 53 et 56) et semblent donc montrer un profil de tolérance intéressant pour la mycoremédiation (sauf *F. oxysporum* pour son caractère phytopathogène évoqué au paragraphe précédent).

Comme avec les 2 autres métaux, le stress induit par Pb implique des perturbations morphologiques et parfois une dépigmentation. Cette dépigmentation est très nette concernant *Chaetomium gracile* (figure 25C et 25D) et *Penicillium oxalicum* (figure 25G et 25H). En effet, le premier perd complètement sa coloration noire et le second devient jaunâtre, son vert prononcé étant fortement atténué. *P. fraxinea* ne semble pas former le mycélium ramifié qu'il formait avec Cd (figure 25E et 25F). Les perturbations morphologiques sont moins marquées avec Pb qu'avec Cd pour cet isolat, qui tolère d'ailleurs mieux Pb (1000 mg.L^{-1}) que Cd (10 mg.L^{-1}). On peut supposer que cette dose de Pb est suffisante pour altérer la croissance, mais pas encore assez toxique pour former le mycélium particulier observé en présence de Cd. Les mécanismes de réponses sont *a priori* encore efficaces à cette

dose pour Pb, alors qu'ils semblaient perturbés avec 10 mg.L^{-1} Cd. Les métaux étant capables de se lier aux membranes biologiques (via les groupements qu'elles portent comme –COOH, -OH, entre autres), on peut supposer que ces perturbations morphologiques sont l'expression de ces perturbations membranaires (Henderson et al. 2017).

Pour des raisons de solubilité, le sel métallique utilisé (nitrate de Pb) est différent des autres métaux (sulfate de Cd et sulfate de Cu). Or d'après Gadd (2008), les nitrates favorisent la croissance fongique. Il est donc possible que l'usage de ce sel ait favorisé la croissance des isolats, bien qu'aucune dose de Pb testée n'accélère la croissance par rapport au témoin ni ne semble produire plus de biomasse. Une étude comparative avec des sels différents pourrait répondre à cette question. Pb semble donc être bien toléré par ce groupe d'isolats fongiques, même si des espèces souvent citées en bioremédiation comme *Pleurotus ostreatus* n'en tolèrent que 10 mg.L^{-1} dans nos condition expérimentales.

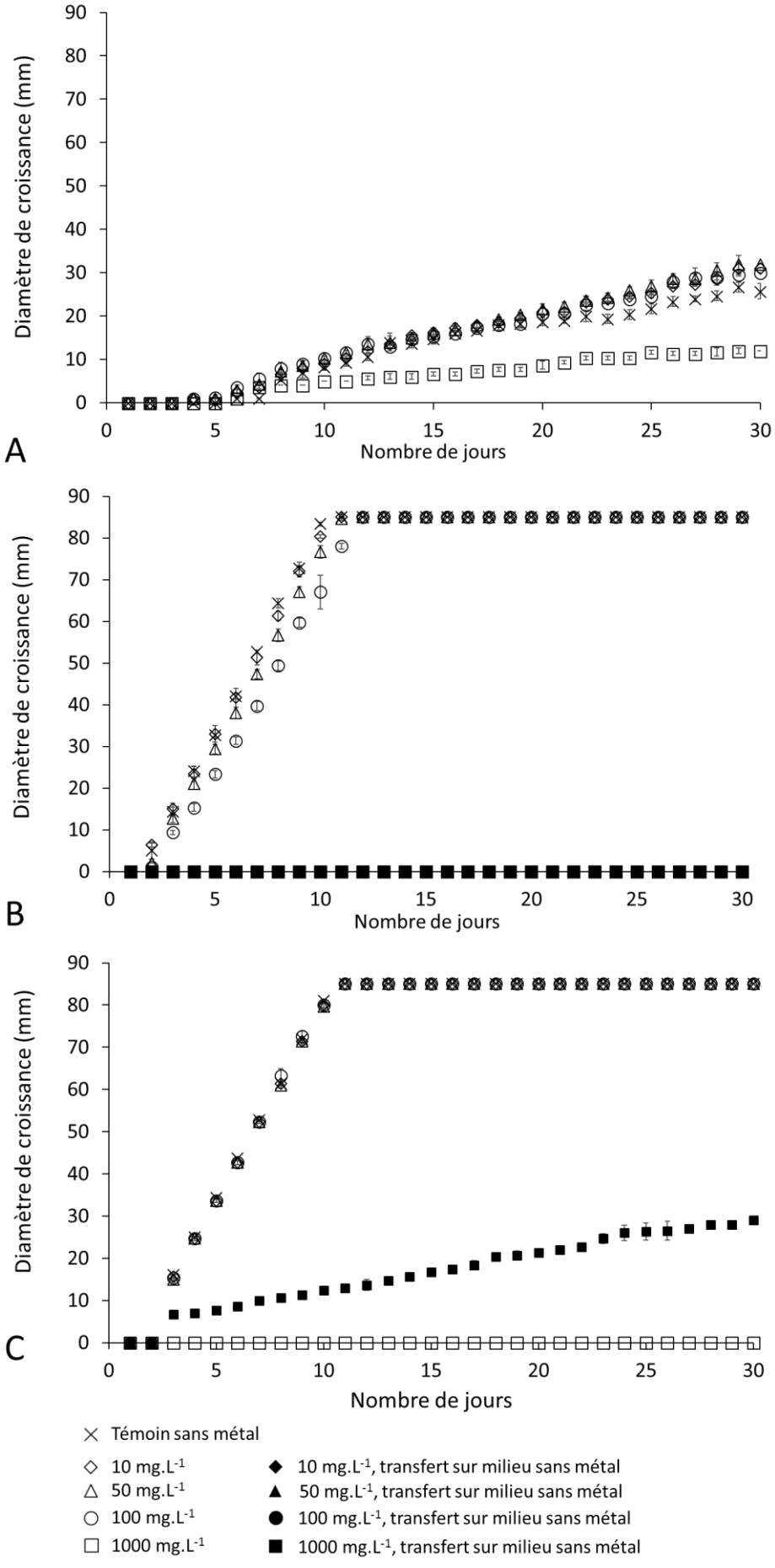


Figure 24 : exemples de profils de tolérance au Pb de 3 isolats de notre étude : Agaricus bisporus (A), Coprinellus micaceus (B) et Ganoderma resinaceum (C).

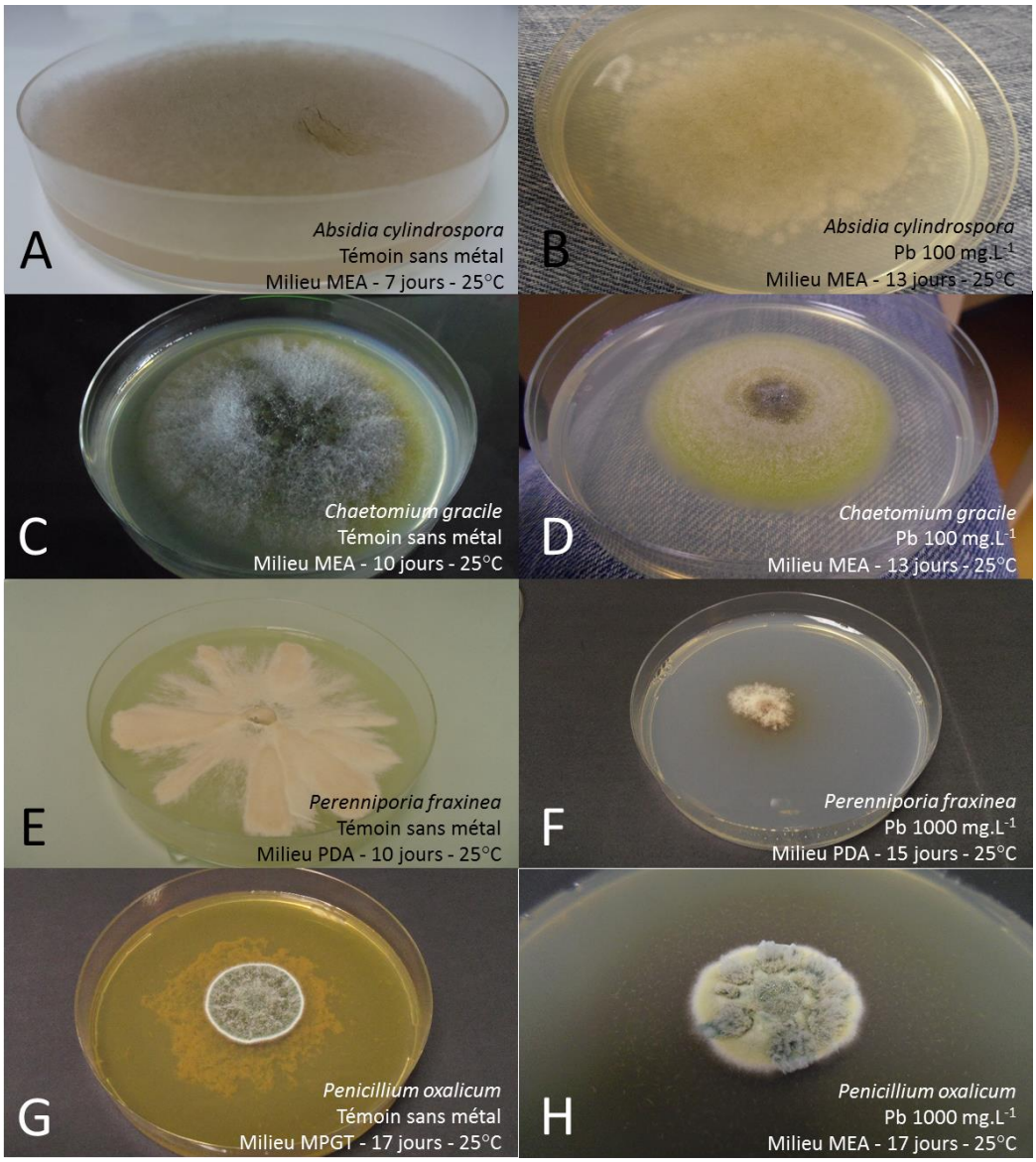


Figure 25 : exemples de modifications morphologiques engendrées par différentes concentrations de Pb en milieu gélosé, chez 4 isolats de l'étude : Absidia cylindrospora [témoin sans métal (A) et Pb 100 mg.L^{-1} (B)] ; Chaetomium gracile [(témoin (C) et Pb 100 mg.L^{-1} (D)] ; Perenniporia fraxinea [témoin (E) et Pb 1000 mg.L^{-1} (F)] et Penicillium oxalicum [témoin (G) et Pb 1000 mg.L^{-1})].

II.1.3. Conclusion

Ce test en milieu gélosé montre que Pb est le métal le mieux toléré par un plus grand nombre d'isolat (9 isolats tolèrent 1000 mg.L^{-1} et 13 tolèrent jusqu'à 100 mg.L^{-1}). Il est suivi de Cd (1 seul isolat tolère 1000 mg.L^{-1} et 17 tolèrent 100 mg.L^{-1}), puis de Cu (1 seul isolat tolère 1000 mg.L^{-1} et 12 tolèrent 100 mg.L^{-1}). Il n'est pas surprenant que ce dernier (Cu) soit le moins toléré des 3 métaux en raison de ses propriétés antifongiques reconnues.

Les perturbations morphologiques sont variées en fonction de l'isolat, du métal considéré, de la dose. Elles sont attribuables à l'action toxique des métaux qui peut engendrer des perturbations membranaires (liaison à des groupements chimiques de la membrane) et/ou des perturbations physiologiques (expression de la chitine, inhibition enzymatique). Ces perturbations incluent principalement une croissance ralentie et une morphologie altérée (mycélium en "croûte", modifications de ramification, pigmentation, sporulation) (Henderson, 2017). Les mécanismes d'acquisition des minéraux comprennent souvent des pigments. Nos résultats suggèrent donc que ces mécanismes sont altérés par Cd, Cu et Pb. Par exemple, le métabolisme de la mélanine, parfois citée comme liée à la sorption des métaux pourrait être altéré ici (Fomina er Gadd 2003 ; Haferburg et Kothe 2010).

Les 2 Agarics présentent une bonne tolérance aux 3 métaux (100 mg.L^{-1} pour Cd et Cu et 1000 mg.L^{-1} pour Pb). Améliorer leur production de biomasse pourrait être un bon moyen de mettre à profit cette tolérance dans des techniques de mycoremédiation. La même remarque est valable pour *Humicola fuscoatra, Humicola sp, Coniochaeta hoffmanii, Pseudeurotium bakeri.* Le micromycète *Absidia cylindrospora* semble surtout intéressant vis-à-vis de Cd (tolérance jusqu'à 1000 mg.L^{-1} sans perturbations morphologiques majeures). *Fusarium oxysporum* présente un profil intéressant vis-à-vis de Cu (tolérance 1000 mg.L^{-1}) et Pb (tolérance 1000 mg.L^{-1}) mais son caractère phytopathogène n'est pas en faveur d'une utilisation sur le terrain. Des espèces du même genre, mais non phytopathogènes, pourraient représenter une alternative intéressante.

II.2. Essai de biosorption en milieu liquide

II.2.1. Etude préliminaire avec *Absidia cylindrospora*

Cette étude préliminaire a pour but d'étudier la biosorption des métaux avec notre souche modèle afin de sélectionner les paramètres "dose" et "temps d'exposition" qui seront ensuite appliqués à l'ensemble des 28 isolats de l'étude. Les résultats de cette étude préliminaire ont fait l'objet d'une publication dans la revue Chemosphere (Albert et al. 2018). Lors de cette étude, plusieurs paramètres ont été suivis, tels que la production de biomasse, le pH, les quantités de métaux adsorbés, absorbés et biosorbés, qui seront présentés, puis discutés dans les paragraphes suivants.

II.2.1.1. Evolution de la biomasse et du pH

La figure 26 montre la production de biomasse pour chaque essai, exprimée en pourcentage, selon (1), par rapport au témoin correspondant. Les valeurs moyennes de production de biomasse sont mentionnées dans le tableau 33 de l'annexe V (page 243). Le tableau 34 de l'annexe V détaille les résultats de biosorption (page 243).

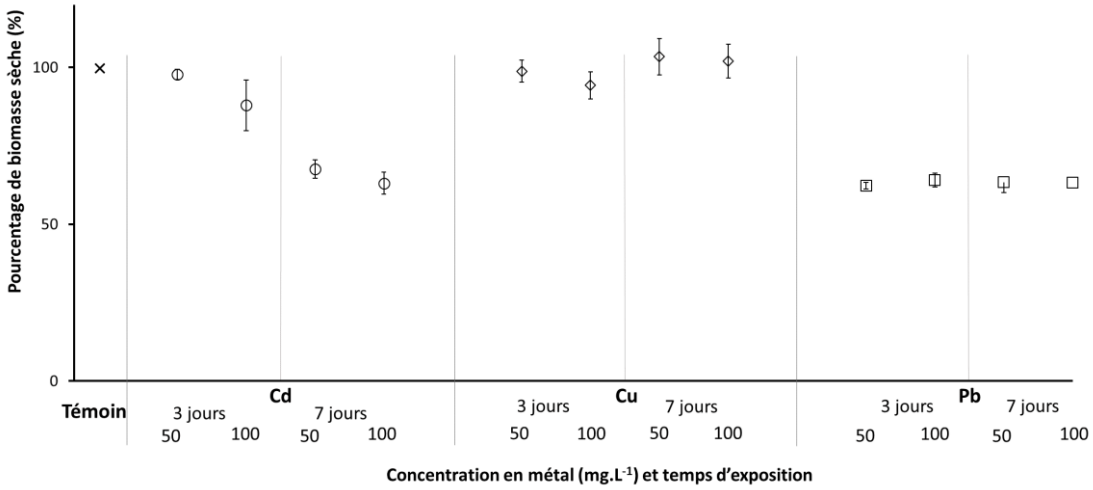


Figure 26 : évaluation de la biomasse fongique d'A. cylindrospora après exposition aux métaux en milieu liquide. Les pourcentages représentent la masse de mycélium produite par l'isolat par rapport au témoin (sans métal) dans les mêmes conditions.

Le tableau 20 présente les valeurs de pH du milieu de culture mesurées au début et à la fin de l'expérience. Deux témoins sans métaux ont été réalisés. Le premier contient seulement le milieu de culture et montre la stabilité du pH du milieu de culture tout au long de l'expérience (pH = 5,4). Le second contient le milieu de culture et le mycélium d'*Absidia cylindrospora* (mais pas de métal) et montre une baisse de pH après 3 et 7 jours de culture. Cette baisse de pH est attendue et attribuée au métabolisme des sucres qui acidifie le milieu de culture (Gadd 2004 ; chapitre 1 paragraphe IV.4, page 63). Le pH du milieu varie ainsi de 5,4 à 4,0 après 3 jours et à 3,6 après 7 jours de culture. Trois autres témoins contenant chacun le milieu de culture et un des 3 sels métalliques utilisés (à la dose de 100 $mg.L^{-1}$) ont aussi été réalisés et montrent l'influence de ces sels métalliques sur le pH du milieu de culture : leur présence induit une légère baisse de pH après 3 jours, mais cette influence n'évolue pas à 7 jours. En effet, après 7 jours, les pH sont respectivement les mêmes qu'à 3 jours. Ainsi, $CdSO_4$ diminue le pH de 0,2 unités après 3 jours (qui passe alors de 5,4 à 5,2) ; $CuSO_4$ diminue le pH de 5,4 à 4,4 et enfin $PbNO_3$ diminue le pH de 5,4 à 4,9. On peut donc s'attendre à une baisse de pH au cours des essais, due à l'action combinée du métabolisme fongique et des sels utilisés.

Tableau 20 : moyennes des valeurs de pH au cours de l'expérience en milieu liquide (3 réplicats). Les écart-types sont donnés entre parenthèse.

Condition	**pH_0**	**pH_2**	
		3 jours	**7 jours**
Milieu de culture seul (témoin)	5,4 (0,0)	5,4 (0,0)	5,4 (0,0)
Témoin Sans métal Avec mycelium	5,4 (0,0)	4,0 (0,1)	3,6 (0,3)
Témoin Avec métal (100 $mg.L^{-1}$) Sans mycélium	5,4 (0,0)	Cd 5,2 (0,0) Cu 4,4 (0,0) Pb 4,9 (0,1)	Cd 5,2 (0,0) Cu 4,4 (0,0) Pb 4,9 (0,1)
Cd 50 mg L^{-1} Cd 100 mg L^{-1}	5,4 (0,0)	4,2 (0,1) 4,1 (0,1)	1,8 (0,0) 1,5 (0,0)
Cu 50 mg L^{-1} Cu 100 mg L^{-1}	5,4 (0,0)	3,7 (0,0) 3,6 (0,1)	3,8 (0,1) 3,8 (0,1)
Pb 50 mg L^{-1} Pb 100 mg L^{-1}	5,4 (0,0)	2,0 (0,0) 1,8 (0,1)	2,1 (0,1) 1,7 (0,1)

Cas du cadmium

En présence de Cd, à 50 et 100 mg.L^{-1}, après 3 jours de croissance, la biomasse produite par *Absidia cylindrospora* n'est pas statistiquement différente de celle du témoin (p = 0,3939). Les biomasses obtenues aux 2 doses après 7 jours sont comparables entre elles mais significativement inférieures au témoin (p = 0,022). Elles ne représentent alors que 65% du témoin, le défaut de production de biomasse suggère alors la toxicité du Cd dans ces conditions (figure 26). On peut supposer qu'une lyse cellulaire (due à la toxicité du Cd) se manifeste au-delà d'un certain temps. Cette lyse cellulaire pourrait expliquer qu'après 7 jours, la production de biomasse est inférieure à celle produite après 3 jours d'exposition (à la même dose).

Après 3 jours aux 2 doses d'exposition, le pH du milieu de culture (respectivement 4,2 et 4,1) n'est pas statistiquement différent de celui du témoin avec mycélium mais sans métal (4,0 ; p = 0,2424). En revanche, après 7 jours, une baisse importante et statistiquement significative à 1,8 et 1,5 est notée respectivement pour les deux doses (p = 0,0022), comparées aux valeurs obtenues après 3 jours. Cette diminution n'est pas due au développement mycélien puisque le témoin sans métal a un pH deux fois plus élevé (3,6) après 7 jours de culture. Cette diminution significative du pH est probablement due à la sécrétion d'acides organiques par le mycélium. En effet, de nombreux auteurs ont montré que ces sécrétions jouent un rôle important dans la détoxication des métaux, en les complexant (chapitre 1, paragraphe IV.4, page 63). L'acide oxalique est souvent cité comme un di-acide organique majeur de la détoxication des métaux par les champignons (Glasauer et al. 2013; Gadd et al. 2014). *Phanerochaete chrysosporium* est une espèce modèle souvent étudiée vis-à-vis de la biosorption des métaux et de la bioremédiation en général. Chen et al. (2015) ont étudié le profil de sécrétion extra cellulaire (notamment production d'acide oxalique, activité enzymatique des lignine peroxydases et manganèse peroxydases dans le milieu de culture) de cette espèce. Ils ont montré l'induction de la sécrétion d'acide oxalique lors d'un stress par le Cd, confirmant ainsi son rôle dans la stratégie de détoxication de ce champignon.

Pour les 2 doses, le temps d'exposition plus long semble favoriser l'expression de la toxicité du Cd et a la plus forte influence sur le pH et la production de biomasse.

Cas du cuivre

Après exposition à Cu, les biomasses ne sont pas statistiquement différentes et représentent 100% de la biomasse du témoin quelles que soient les durées ou les doses d'expositions ($p = 0,2403$ après 3 jours et $p = 0,3939$ après 7 jours). Cu ne semble pas influencer l'évolution du pH dans nos conditions de culture. Selon ces paramètres, Cu ne semble pas exprimer de toxicité vis-à-vis du développement du mycélium d'*Absidia cylindrospora*. Ces résultats sont assez contrastés avec ceux de l'essai de tolérance en milieu gélosé. En effet, lors de ce précédent essai, *A. cylindrospora* tolérait mieux Cd que Cu (chapitre 3, paragraphe II.1, page 104). Or, ici, les résultats semblent suggérer que Cu est mieux toléré que Cd en milieu liquide.

Les résultats suggèrent que Cu n'altère pas la production de biomasse et n'induit pas de production d'acides en milieu liquide, dans les conditions expérimentales utilisées. On pourrait aussi supposer qu'un mécanisme de défense efficace puisse s'exprimer en milieu liquide mais pas en milieu gélosé (ou ne pouvant diffuser suffisamment dans le milieu gélosé pour capter Cu et bloquer son action toxique).

Cas du plomb

Dans toutes les conditions testées, Pb altère la production de biomasse de manière équivalente ($p = 0,937$ après 3 jours et $p = 0,9372$ après 7 jours). La biomasse représente alors 65 % de la biomasse du témoin. Ces 2 doses perturbent donc le développement fongique aux 2 temps d'exposition de façon similaire.

Concernant le pH, Pb semble aussi avoir une influence importante et rapide puisque quels que soient la dose et le temps d'exposition, une forte baisse, jusqu'à un pH de 2, est enregistrée.

Ces résultats suggèrent donc que Pb altère la production de biomasse et induit la production d'acides dans toutes les conditions de l'expérience.

II.2.1.2. Conclusion

Ces résultats suggèrent qu'un temps plus long d'exposition permet l'expression de la toxicité du Cd qui se traduit par une production de biomasse plus faible par rapport au témoin et une influence sur le pH plus forte après 7 jours d'exposition. Les conditions de culture en milieu liquide ne permettent pas l'expression de la toxicité de Cu, qui est pourtant un antifongique reconnu. Enfin, Pb semble être l'élément le plus perturbateur puisqu'une influence importante sur la production de biomasse et le pH est notée même à la dose la plus faible et après le temps d'exposition le plus court. Finalement, dans ces conditions, Pb est le métal le plus perturbateur, suivi de Cd, puis de Cu. Ces résultats contrastent avec l'essai de tolérance en milieu gélosé à la fin duquel Cu était le moins toléré, suivi de Pb et de Cd. Une biodisponibilité différente des sels métalliques, ou une efficacité différente des mécanismes de défense (lié à la diffusion des molécules sécrétées) dans ces deux types de milieu (solide et liquide) est peut-être à l'origine de ces différences.

On note donc le rôle important des conditions expérimentales appliquées qui semblent influencer la réponse au stress induit par les métaux chez les champignons. On note également que les nitrates ne semblent pas réduire la toxicité du Pb vis-à-vis de la production de biomasse comme évoqué au chapitre 3, paragraphe II.1.2 (page 117).

II.2.1.3. Evaluation des capacités de biosorption

La figure 27 montre les pourcentages de biosorption et d'absorption de Cd, Cu et Pb (calculés selon les équations 2 à 5, chapitre 2, paragraphe II.2.3.3, page 85) par *Absidia cylindrospora* selon les différentes conditions d'exposition. La figure 28 présente les quantités de métal biosorbé rapportées à la biomasse sèche (équation 6, chapitre 2, paragraphe II.2.3.3, page 85). Ces deux paramètres (pourcentage et quantité) fournissent des informations complémentaires sur la biosorption. En effet, la première renseigne sur la capacité d'un isolat à extraire un ion métallique de son milieu de culture ; la seconde informe des capacités de concentration au sein du mycélium. Ces capacités étant liées aux structures fongiques de surface (paroi et membranes), il est attendu qu'un isolat fournissant beaucoup de

biomasse devrait être en mesure de mieux biosorber un métal, à condition que la toxicité du métal n'altère pas les mécanismes mis en jeu au cours du phénomène. L'ensemble des valeurs expérimentales est donné dans l'annexe V (tableaux 33 et 34, page 243).

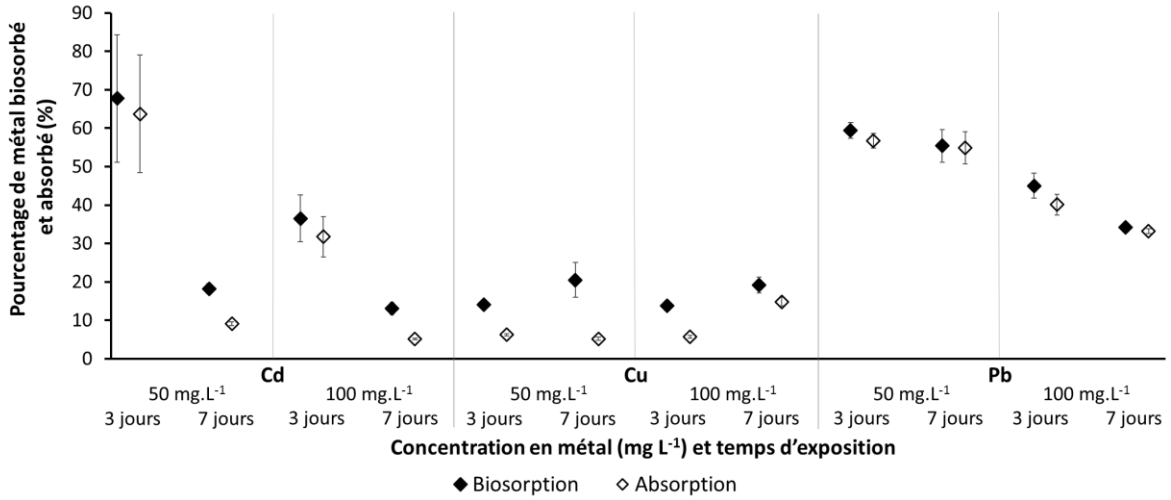


Figure 27 : pourcentages de biosorption et d'absorption des métaux par Absidia cylindrospora selon les différentes conditions d'exposition (d'après Albert et al., 2018).

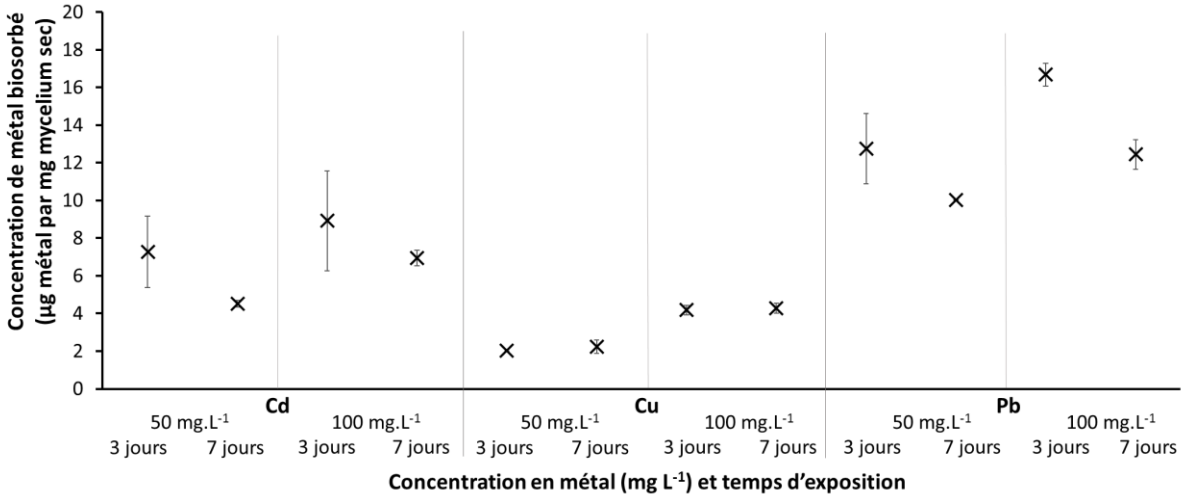


Figure 28 : quantité de métal biosorbé en fonction de la biomasse sèche produite par Absidia cylindrospora selon les différentes conditions d'exposition (d'après Albert et al., 2018).

Cas du cadmium

Comme le montre la figure 27, après 3 jours d'exposition à 50 $mg.L^{-1}$ le pourcentage de biosorption le plus élevé (67%) est observé. Sous ces conditions, le pH et la biomasse restent équivalents aux paramètres du témoin (pH = 4,2 ; biomasse mesurée = 100%), suggérant un stress faible, voire absent. La biosorption est significativement plus faible (18%) après 7 jours d'exposition (p = 0,0022), tout comme le pH et la production de biomasse sont diminués (pH = 1,2, biomasse de 65%). Une augmentation de la dose à 100 $mg.L^{-1}$ ne permet pas une meilleure biosorption ni après 3 jours (36%), ni après 7 jours d'exposition (13%). L'absorption est majoritaire quelles que soient les conditions de l'expérimentation (figure 28). Les concentrations absorbées sont aussi plus importantes après 3 jours, pour les 2 doses, comme le montre la figure 28 : 6,9 $\mu g.mg^{-1}$ et 4,6 $\mu g.mg^{-1}$ respectivement après 3 jours et après 7 jours à la dose de 50 $mg.L^{-1}$ et 9 $\mu g.mg^{-1}$ et 7 $\mu g.mg^{-1}$ respectivement après 3 jours 7 jours à la dose de 100 $mg.L^{-1}$ (annexe V, tableau 34, page 243). Pour ce métal, une augmentation de la dose ou un allongement du temps d'exposition ne permettent pas d'améliorer significativement la biosorption par *A. cylindrospora* (p = 0,1797). On peut supposer en revanche que le métal exprime sa toxicité sur le mycélium (biomasse et pH plus faibles) et peut potentiellement inhiber les phénomènes de sorption, voire entraîner la lyse partielle du mycélium et le relargage d'ions métalliques.

Cas du cuivre

Concernant Cu, les pourcentages maximums de biosorption sont atteints après 7 jours pour les deux doses. Ces pourcentages sont proches : 20% à la dose de 50 $mg.L^{-1}$ et 19% à la dose de 100 $mg.L^{-1}$. Ils sont significativement supérieurs aux pourcentages (14% pour les deux doses) obtenus après 3 jours (p = 0,0022). L'adsorption est supérieure à l'absorption pour ce métal dans la plupart des conditions expérimentales. L'absorption n'est prédominante que pour la dose de 100 $mg.L^{-1}$ après 7 jours (14,9% pour un total biosorbé de 19,2%).

Pour toutes les conditions de temps et de dose d'exposition, la biomasse produite atteint 100% comparativement au témoin et le pH n'est pas altéré et reste proche de 3,7 (± 0,1). Dans ces conditions qui ne semblent pas toxiques, il semble logique que le maximum de biosorption soit atteint après 7 jours

d'exposition, permettant plus de temps pour les réactions de sorption au niveau de la paroi et de la membrane fongique.

En revanche, ces pourcentages restent plus faibles que pour les 2 autres métaux testés (malgré plus de biomasse produite, annexe V, tableau 33, page 243). De plus, les concentrations biosorbées sont de 2 µg.mg^{-1} à la dose de 50 mg.L^{-1} et de 4 µg.mg^{-1} à la dose de 100 mg.L^{-1}. Ces concentrations sont les mêmes (pour chaque dose considérée) quel que soit le temps d'exposition. La concentration biosorbée double lorsque la dose d'exposition double, mais le temps d'exposition ne semble pas influant. Il serait intéressant de tester plusieurs concentrations afin de confirmer le lien qui semble se dessiner ici entre la concentration biosorbée et la dose d'exposition. L'étude publiée par Li et al. (2009) a aussi montré une augmentation de la concentration biosorbée avec l'augmentation de la concentration en Cu dans le milieu de culture. Cette observation a été rapportée pour les espèces *Cladosporium cladosporioides, Gliomastix murorum* et *Bjerkandera sp.*

Cas du plomb

Concernant Pb, le maximum de biosorption est aussi observé après 3 jours à 50 mg.L^{-1} et atteint 59%. Le temps d'exposition plus long ne modifie pas significativement ce pourcentage ($p = 0,2403$). A la dose de 100 mg.L^{-1}, les pourcentages de biosorption sont significativement plus faibles aux deux temps d'exposition : 50% après 3 jours et 40% après 7 jours ($p = 0,0022$). La production de biomasse et le pH sont systématiquement plus faibles après exposition au Pb, quels que soient les doses et les temps d'exposition. Ces résultats suggèrent que pour ce métal, une augmentation de dose ou de temps d'exposition favorise l'expression de la toxicité du Pb, ce qui a pour conséquence de diminuer la production de biomasse et les capacités de biosorption.

II.2.2. Discussion

Pour Cd et Pb, les pourcentages de biosorption sont supérieurs après 3 jours d'exposition à la dose de 50 mg.L^{-1}. Une exposition plus longue ne permet pas une meilleure biosorption pour Cd et Pb. Les

meilleurs taux de biosorption sont obtenus lorsque le pH et la biomasse sont proches des valeurs témoins. Cela confirme que l'intégrité membranaire est nécessaire aux réactions de sorption. Un pH trop bas peut en effet altérer les groupements chimiques membranaires (protonation/déprotonation) qui sont nécessaires pour ces réactions (Fourest and Chambaz 1993; Das 2010; Dhankhar and Hooda 2011; Desaunay 2011). Le pourcentage de biosorption de Cu est légèrement supérieur après 7 jours, quelle que soit la dose d'exposition (20% après 7 jours, contre 14% après 3 jours). Aucune altération de production de biomasse ou de pH n'est enregistrée pour ce métal. On peut donc supposer qu'un temps plus long permet au mycélium de biosorber plus de métal, tout au long de son développement.

Quelles que soient les conditions, Pb est le métal le plus concentré au sein du mycélium malgré son impact sur le pH et la production de biomasse. Les concentrations maximales atteignent 13 µg de métal par mg^{-1} de mycélium sec ($\mu g.mg^{-1}$) après 3 jours à 50 $mg.L^{-1}$ et 17 $\mu g.mg^{-1}$ après 7 jours à la même dose. Les concentrations en Cd sont respectivement de 7 et 9 $\mu g.mg^{-1}$ pour les mêmes conditions (figure 28), ce qui correspond à la gamme de teneurs rapportées pour cet élément par d'autres espèces fongiques dans la littérature. Ainsi, Li et al. (2017) ont étudié la biosorption de Cd (et Cr) par *Pleurotus ostreatus*. Les auteurs rapportent un maximum de biosorption de 1,9 $\mu g.mg^{-1}$ après 10 jours d'exposition à la dose de 50 $mg.L^{-1}$. Taboski et al. (2005) ont mis en évidence une biosorption de Cd à hauteur de 7,4 $\mu g.mg^{-1}$ après 30 jours à cette même dose pour l'espèce marine *Corollospora lacera.* Dans la même étude, après 30 jours (50 $mg.L^{-1}$ de Cd), l'espèce *Monodictys pelagica* biosorbait 15,6 $\mu g.mg^{-1}$.

Dans notre étude, pour une dose donnée, les concentrations et les pourcentages en Cd et Pb biosorbés diminuent lorsque le temps d'exposition augmente. Les concentrations biosorbées augmentent cependant lorsque la dose de métal dans le milieu augmente. Pour Li et al. (2004), les maximums de biosorption de Cd et Pb par *Phanerochaete chrysosporium*, après une exposition à 50 $mg.L^{-1}$ sont respectivement de 15,2 $\mu g.mg^{-1}$ pour Cd et 12,3 $\mu g.mg^{-1}$ pour Pb, avec un pH optimal de biosorption de 4,5 pour les deux métaux. Dans notre étude, le pH a tendance à diminuer avec le temps d'exposition et passe de à 5,4 à 2. Cette baisse de pH peut expliquer en partie la baisse de biosorption, un pH bas favorisant la protonation des groupements tels que –COOH et –OH qui ne seront plus chargés négativement et seront donc moins à même de se lier aux ions métalliques (chargés positivement). Les

pH trop bas ne sont donc pas en faveur des réactions membranaires de biosorption. Nos résultats concernant Cd sont cohérents avec l'étude de Li et al. (2004) puisque le pourcentage maximum de biosorption est atteint lorsque le pH est autour de 4.

Holan et Volesky (1995) ont étudié la biosorption de Cd et Pb par *Absidia orchidis*. Dans leur étude, la surface mycélienne avait été chimiquement modifiée par addition de groupements susceptibles de lier les métaux (groupements phosphoryles et sulfoéthyles) et le pH était maintenu constant à 3,5. Dans ces conditions, cette espèce biosorbait 14 $\mu g.mg^{-1}$ de Pb et 4 $\mu g.mg^{-1}$ de Cd, ce qui reste très proches des résultats obtenus ici (respectivement 13 et 7 $\mu g.mg^{-1}$).

Dans notre expérience, le Pb est le métal le mieux biosorbé, suivi de Cd et de Cu. Ce dernier apparaît comme le plus toxique en milieu gélosé mais n'influence pas le pH ou la quantité de biomasse produite en milieu liquide dans les conditions testées. Cu est aussi le moins biosorbé des 3 métaux, aussi bien en considérant les pourcentages que les concentrations. Inversement, Cd et Pb semblent être mieux tolérés en milieu gélosé, mais ont une plus grande influence en milieu liquide sur ces paramètres. Pour Cd, le pourcentage de biosorption le plus élevé est atteint lorsque le pH et la biomasse correspondent aux valeurs du témoin, c'est à dire en absence de métal. En revanche, Pb est le métal le plus biosorbé en dépit de son influence qui entraîne une diminution du pH et du pourcentage de biomasse produite dans toutes les conditions de l'étude. Des mécanismes de biosorption et de tolérance différents semblent donc mis en jeu vis-à-vis de ces éléments.

Pour les 3 métaux étudiés, le pourcentage de biosorption est corrélé avec le pH en fin d'exposition (pH_2) : $r = 0,93593$ pour Cd ($p < 0,0001$) ; $r = 0,71631$ pour Cu ($p = 0,0088$) et $r = 0,71830$ ($p = 0,0085$) pour Pb. La production de biomasse est aussi corrélée avec le pourcentage de biosorption de Cd ($r = 0,8951$; $p < 0.0001$) et de Cu ($r = 0,69930$; $p = 0,0114$). Cette corrélation n'est pas retrouvée avec Pb qui est biosorbé alors que la production de biomasse est systématiquement altérée. Ces résultats, en accord avec la littérature scientifique, illustrent l'importance des paramètres tels que le pH, la biomasse, la dose et le temps d'exposition dans les phénomènes de biosorption des métaux.

II.2.3. Conclusion

L'étude préliminaire avec *A. cylindrospora* a permis de montrer que cet isolat tolère et biosorbe différemment Cd, Cu et Pb, qui sont des polluants majeurs de l'environnement. Cd est le mieux toléré en milieu gélosé, suivi de Pb et de Cu. En milieu liquide, Cu semble être le métal le mieux toléré, suivi de Cd et de Pb. On note que les conditions d'exposition ont un impact sur les capacités de biosorption d'*A. cylindrospora*. Après seulement 3 jours d'exposition, cet isolat fongique est capable de biosorber 14% du Cu et plus du 50% de Cd et du Pb.

II.2.4. Application aux 28 isolats fongiques de l'étude

L'étude préliminaire avec *A. cylindrospora* a permis de définir des paramètres de temps d'exposition, fixé à 3 jours, et de dose d'exposition, fixée à 50 $mg.L^{-1}$, qui sont retenus pour l'expérience de biosorption en milieu liquide. Les résultats concernant le pH et la production de biomasse des 28 isolats fongiques sont présentés dans les tableaux 21, 22 et 23. Les figures 29 et 30 montrent respectivement les pourcentages et les concentrations de métaux biosorbés par ces champignons. L'ensemble des valeurs expérimentales est présenté dans l'annexe VI (tableaux 35 à 38, page 245).

Les résultats de cette étude font l'objet d'une publication ("Selection of soil fungi with high tolerance and biosorption of three trace metals (Cd, Cu, and Pb)" à soumettre ; annexe XI, page 277).

Tableau 21 : biomasses mesurées à l'issue des 3 jours d'exposition du screening.

Sols	Isolats		Témoins	Cd	Cu	Pb
			Biomasse (mg)	Biomasse (mg)	Biomasse (mg)	Biomasse (mg)
1	***Absidia cylindrospora***	**moy** EC	**99** 3	**91** 1	**90** 4	**89** 1
2	***Agaricus arvensis***	**moy** EC	**70** 15	**46** 1	**47** 2	**52** 4
	Agaricus bisporus	**moy** EC	**44** 10	**33** 1	**26** 8	**33** 1
	Fomes fomentarius	**moy** EC	**65** 3	**42** 1	**39** 2	**45** 3
	Laetiporus sulphureus	**moy** EC	**29** 1	**29** 4	**29** 7	**33** 2
	Megacollybia platyphylla	**moy** EC	**158** 3	**100** 10	**164** 30	**115** 17
	Pleurotus ostreatus	**moy** EC	**73** 19	**52** 6	**42** 1	**60** 5
	Pleurotus pulmonarius	**moy** EC	**58** 10	**49** 5	**52** 4	**61** 15
3	***Chaetomium atrobrunneum***	**moy** EC	**119** 3	**73** 2	**93** 10	**116** 1
	Chaetomium gracile	**moy** EC	**61** 2	**45** 4	**37** 2	**57** 1
	Coprinellus xanthothrix	**moy** EC	**63** 3	**36** 2	**31** 2	**44** 1
	Humicola fuscoatra	**moy** EC	**48** 3	**30** 17	**36** 9	**60** 3
	Sordaria lappae	**moy** EC	**132** 18	**63** 2	**75** 9	**125** 23
4	***Coprinellus micaceus***	**moy** EC	**44** 9	**30** 6	21 4	**46** 5
	Emericellopsis minima	**moy** EC	**144** 7	**116** 10	**93** 8	**140** 7
	Ganoderma resinaceum	**moy** EC	**30** 1	**12** 1	**23** 4	**21** 2
	Humicola sp	**moy** EC	**116** 7	**55** 10	**50** 1	**110** 19
	Penicillium oxalicum	**moy** EC	**140** 2	**90** 3	**127** 5	**122** 3
	Perenniporia fraxinea	**moy** EC	**288** 7	**201** 14	**182** 10	**251** 3

Sols	Isolats		Témoins	Cd	Cu	Pb
			Biomasse (mg)	Biomasse (mg)	Biomasse (mg)	Biomasse (mg)
4	***Petriella sp***	**moy** EC	**20** 3	**18** 4	**21** 1	**23** 2
	Pseudeurotium bakeri	**moy** EC	**128** 13	**86** 9	**66** 4	**118** 9
5	***Irpex lacteus***	**moy** EC	**54** 4	**34** 6	**41** 13	**65** 13
	Phaeophlebiopsis peniophoroides	**moy** EC	**31** 4	**23** 1	**22** 1	**20** 1
	Psathyrella candolleana	**moy** EC	**26** 2	**24** 3	**16** 2	**29** 2
	Schizophyllum commune	**moy** EC	**84** 7	**45** 1	**44** 2	**84** 7
	Xylaria sp	**moy** EC	**93** 21	**33** 2	**30** 1	**85** 6
6	***Coniochaeta hoffmanii***	**moy** EC	**79** 10	**70** 4	**71** 7	**103** 4
	Fusarium oxysporum	**moy** EC	**49** 3	**24** 10	**40** 3	**21** 3

moy : moyenne de 3 réplicats
EC **:** écart-type

Tableau 22 : variations de pH et production de biomasse au cours du screening des différents groupes taxonomiques en milieu liquide.

Métal	Paramètres		Zygomycètes (n = 1)	Ascomycètes (n = 12)	Basidiomycètes (n = 15)	Total (n = 28)
Cd	ΔpH	moy	**0,2**	**0,1**	**0,3**	**0,2**
		EC	0,1	0,3	0,5	0,4
	BP	moy	**92**	**64**	**70**	**68**
		EC	1	14	11	13
Cu	ΔpH	moy	**0,1**	**-0,6**	**-0,2**	**-0,4**
		EC	0,1	0,3	0,5	0,4
	BP	moy	**91**	**65**	**72**	**72**
		EC	5	18	14	16
Pb	ΔpH	moy	**0,4**	**0,1**	**0,1**	**0,1**
		EC	0,1	0,3	0,3	0,3
	BP	moy	**90**	**98**	**88**	**92**
		EC	2	14	17	16

ΔpH : variation de pH, par rapport au témoin sans métal, à l'issue de l'expérience de biosorption en milieu liquide.
BP : pourcentage de biomasse produite, par rapport au témoin sans métal, à l'issue de l'expérience de biosorption en milieu liquide.
moy : moyenne de 3 réplicats
EC : écart-type

Tableau 23 : variations de pH et productions de biomasse obtenues au cours du screening des 28 isolats fongiques.

Sols	Isolats	Cd 50 mg L^{-1}		Cu 50 mg L^{-1}		Pb 50 mg L^{-1}	
		ΔpH	BP	ΔpH	BP	ΔpH	BP
1	***Absidia cylindrospora***	+0,2	92	+0,1	91	+0,4	90
2	***Agaricus arvensis***	-0,2	66	-0,4	67	-0,2	74
	Agaricus bisporus	-0,1	75	-0,9	59	-0,3	75
	Fomes fomentarius	+0,6	64	-0,4	61	+0,7	70
	Laetiporus sulphureus	+0,3	98	-0,1	99	-0,1	111
	Megacollybia platyphylla	+0,1	64	-0,3	103	+0,1	73
	Pleurotus ostreatus	0	72	**-1,2**	**57**	-0,3	82
	Pleurotus pulmonarius	**+1,8**	84	**+1,1**	90	+0,8	105
3	***Chaetomium atrobrunneum***	**+1**	61	0	79	-0,3	98
	Chaetomium gracile	+0,3	74	-0,2	61	-0,2	93
	Coprinellus xanthothrix	-0,1	**57**	**-1,1**	49	+0,2	70
	Humicola fuscoatra	+0,3	64	-0,4	76	**+1,1**	126
	Sordaria lappae	-0,2	**47**	-0,7	57	0	95
4	***Coprinellus micaceus***	**+1,4**	68	**+1,1**	90	+0,8	105
	Emericellopsis minima	-0,1	80	**-1,1**	64	0,1	102
	Ganoderma resinaceum	**+1,1**	**40**	+0,1	78	-0,1	70
	Humicola sp	-0,5	**47**	-0,8	**43**	+0,1	99
	Penicillium oxalicum	-0,1	64	-0,2	91	0	87
	Perenniporia fraxinea	0	70	0	63	0	87
	Petriella sp	+0,1	93	-0,6	106	+0,4	116
	Pseudeurotium bakeri	+0,3	67	-0,8	**52**	+0,3	93
5	***Irpex lacteus***	-0,1	62	-0,1	77	0	120
	Phaeophlebiopsis peniophoroides	-0,3	75	-0,4	70	-0,1	66
	Psathyrella candolleana	+0,2	94	-0,4	65	+0,2	114
	Schizophyllum commune	-0,3	**54**	-0,4	**52**	-0,1	100
	Xylaria sp	+0,3	**36**	-0,4	**33**	0	92
6	***Coniochaeta hoffmanii***	-0,3	88	**-1,2**	89	-0,3	130
	Fusarium oxysporum	-0,4	**49**	-0,7	82	-0,4	**43**

ΔpH : variation de pH, par rapport au témoin sans métal, à l'issue de l'expérience de biosorption en milieu liquide. Les plus grandes variations sont en gras.

BP : pourcentage de biomasse produite, par rapport au témoin sans métal, à l'issue de l'expérience de biosorption en milieu liquide.

Le tableau 21 montre la diversité des champignons dans leur production de biomasse. Ainsi, *Agaricus bisporus* ne produit que 44 mg de biomasse après 3 jours, alors que *Perenniporia fraxinea* produit jusqu'à 288 mg dans le même intervalle de temps alors que tous deux sont des Basidiomycètes. On note également que certaines espèces montrent des productions de biomasse plus variables, comme par exemple *Megacollybia platyphylla* pour qui l'écart-type s'élève à 30 mg lors de l'exposition au Cu alors que l'écart-type moyen pour ce métal est de 5 mg (pour une médiane de 4 mg). Cette variation représente 20% de la biomasse produite pour cet isolat, tandis qu'en général, on observe plutôt une variation autour de 10% (tous isolats confondus pour ce métal). Cette variation peut aussi être le reflet de la toxicité du Cu qui perturbe la croissance fongique.

II.2.4.1. Evolution du pH et de la biomasse

Cas du cadmium

En présence de Cd, la production de biomasse des isolats atteint 36 à 100% de leurs témoins respectifs sans Cd, avec une moyenne de 68% tous isolats confondus (tableaux 22 et 23). Le tableau 22 montre que, comparativement à leur témoins respectifs, l'isolat *Absidia cylindrospora* produit plus de biomasse (92%) que les Ascomycètes (64%) et les Basidiomycètes (70%), qui sont quant-à-eux comparables entre eux ($p = 0,1828$) mais semblent plus sensibles à Cd.

Les variations de pH vont de -0,5 (pour *Humicola sp*) à +1,8 (pour *Pleurotus ostreatus*) pour une variation moyenne de 0,2 (tableaux 22 et 23). Ces variations sont rarement supérieures ou égales à 0,5 unité pH. Toutes souches confondues, ces variations ne sont pas statistiquement significatives ($p = 0.06$) comparées au pH initial du milieu de culture.

Ces résultats sont cohérents avec ceux de l'étude préliminaire qui montrait un impact non significatif sur la production de biomasse et sur le pH après exposition. Cependant, les productions de biomasses (tableau 21, valeurs en gras) semblent parfois plus impactées (7 souches ont une production de biomasse réduite de plus de 40% par rapport à leur témoin) au cours du screening comparativement

à l'étude préliminaire. Il semble qu'*Absidia cylindrospora* tolère mieux Cd que les autres isolats (meilleure production de biomasse).

Cas du cuivre

Les biomasses produites atteignent de 33 à 100% des témoins sans Cu, pour une moyenne de 72% (tableaux 22 et 23). Comme avec Cd, *Absidia cylindrospora* produit plus de biomasse (91%) que les Ascomycètes (65%) et les Basidiomycètes (72%) qui sont eux, quant-à-eux, comparables ($p = 0,167$). On remarque également que 6 isolats présentent une production biomasse réduite de plus de 40%.

La variation de pH est négligeable en ce qui concerne *Absidia cylindrospora*, comme lors de l'étude préliminaire. Cependant, en tenant compte de l'ensemble des isolats fongiques, la moyenne des variations est de -0,4. Cette variation des pH avant et après exposition est statistiquement différente ($p = 1,69.10^{-9}$). Le pH diminue après exposition, sauf pour *Pleurotus pulmonarius* et *Coprinellus micaceus* (+1,1 pour ces 2 isolats). Cette baisse de pH significative (mais inférieure à 0,5 unité pH) est un résultat différent de l'étude préliminaire. Ce résultat illustre aussi la diversité des réponses au stress métallique chez les champignons.

Cu semble avoir un impact plus marqué sur les Ascomycètes et les Basidiomycètes que sur le Zygomycètes *Absidia cylindrospora* selon ces paramètres. On note que l'isolat de *Fusarium oxysporum* (seul isolat capable de tolérer 1000 $mg.L^{-1}$ de Cu en milieu gélosé) produit 82% de biomasse en milieu liquide (pour une variation de pH de -0,7). Il semble donc aussi bien tolérer Cu dans ces conditions.

Cas du plomb

Les biomasses produites après exposition au Pb atteignent 43 à 130% des témoins, pour une moyenne de 92% (tableau 20). La majorité des isolats (18 sur 28) produisent entre 70 et 100% de biomasse comparés à leur témoin respectif et 9 isolats produisent plus de 100 %. L'impact de Pb est donc faible sur la production de biomasse, ce qui contraste avec l'étude préliminaire au cours de laquelle la biomasse était diminuée après exposition à Pb (production diminuée de 35% après 3 jours à

50 mg.L^{-1}). L'augmentation de la production de biomasse pourrait être attribué aux nitrates, présents dans le sel de Pb utilisé et qui pourraient favoriser la croissance fongique de certains taxons même si cela n'as pas été retrouvé lors de l'étude préliminaire (qui utilisait pourtant le même sel) (Gadd 2008).

Les variations de pH vont de -0,4 à +1,1, pour une variation moyenne de 0,1 (tableaux 20 et 22). Seul l'isolat *Humicola fuscoatra* montre une variation de pH supérieure à 1 alors que 5 isolats ne montrent aucune variation de pH ($\Delta pH = 0$) à l'issue de l'expérience. Toutes souches confondues, ces variations de pH ne sont pas significatives ($p = 0,08$) par rapport aux témoins, ce qui contraste avec l'étude préliminaire pour laquelle l'influence sur le pH était marquée après 3 jours à 50 mg.L^{-1} (pH autour de 2 et diminution statistiquement significatif avec $p < 0,05$).

L'impact de Pb sur les isolats fongiques est différent par rapport à l'étude préliminaire et moins marqué qu'au cours de cette dernière.

Conclusion

Les paramètres de biomasse et de pH après exposition nous montrent que Cd, Cu et Pb ont un impact plutôt faible sur ces paramètres dans nos conditions expérimentales. Celles-ci sont donc compatibles avec les réactions de sorption des métaux par les mycéliums des différents isolats. On note cependant que des différences apparaissent entre l'étude préliminaire et le screening et que le choix du sel utilisé pourrait influencer la production de biomasse fongique. On note que l'origine de l'isolat semble importante en ce qui concerne la tolérance aux éléments toxiques. Par exemple, *Absidia cylindrospora* provient du sol le plus chargé en Cd (12 mg.kg^{-1}, tableau 17) et est aussi l'isolat qui le tolère le mieux à la fois en milieu liquide et en milieu gélosé. Cette tendance est moins évidente pour les 2 autres métaux.

II.2.4.2. Evaluation des capacités de biosorption

Les résultats de biosorption sont présentés de manière synthétique dans le tableau 24. La figure 29 présente les résultats de biosorption en pourcentage de métal biosorbé par rapport au métal total présent dans le milieu de culture ($\%_{BIOS}$; calculé selon l'équation 4). La figure 30 présente ces résultats

en concentration, c'est-à-dire en quantité de métal biosorbé rapporté à la biomasse fongique sèche (C_{BIOS} ; calculée selon l'équation 5). Les moyennes (et les écart-types) pour chaque isolat testé sont présentées dans l'annexe VI (tableaux 35 à 38, page 245).

Tableau 24 : synthèse des résultats concernant le pourcentage et la concentration de métal biosorbé au cours du screening des 28 isolats fongiques.

Métal	Paramètre		Zygomycètes (n = 1)	Ascomycètes (n = 12)	Basidiomycètes (n = 15)	Total (n = 28)
Cd	$\%_{BIOS}$ (%)	**moy**	**43,2**	**23,8**	**21,5**	**23,3**
		EC	4,8	11,3	7,5	9,6
	C_{BIOS} ($\mu g.mg^{-1}$)	**moy**	**5,9**	**6,3**	**7,2**	**6,8**
		EC	0,6	2,6	3,3	2,8
Cu	$\%_{BIOS}$ (%)	**moy**	**6,2**	**24,5**	**20,9**	**21,9**
		EC	0,4	8,6	4,8	6,7
	C_{BIOS} ($\mu g.mg^{-1}$)	**moy**	**0,9**	**6,7**	**7,4**	**6,9**
		EC	0,1	2,1	2,2	2,3
Pb	$\%_{BIOS}$ (%)	**moy**	**65,6**	**55**	**56,7**	**56,3**
		EC	2,2	25,4	21,4	22,7
	C_{BIOS} ($\mu g.mg^{-1}$)	**moy**	**9,3**	**9,5**	**18,3**	**14,2**
		EC	0,4	4,6	12,5	9,1

moy : moyenne de 3 réplicats
EC : écart-type

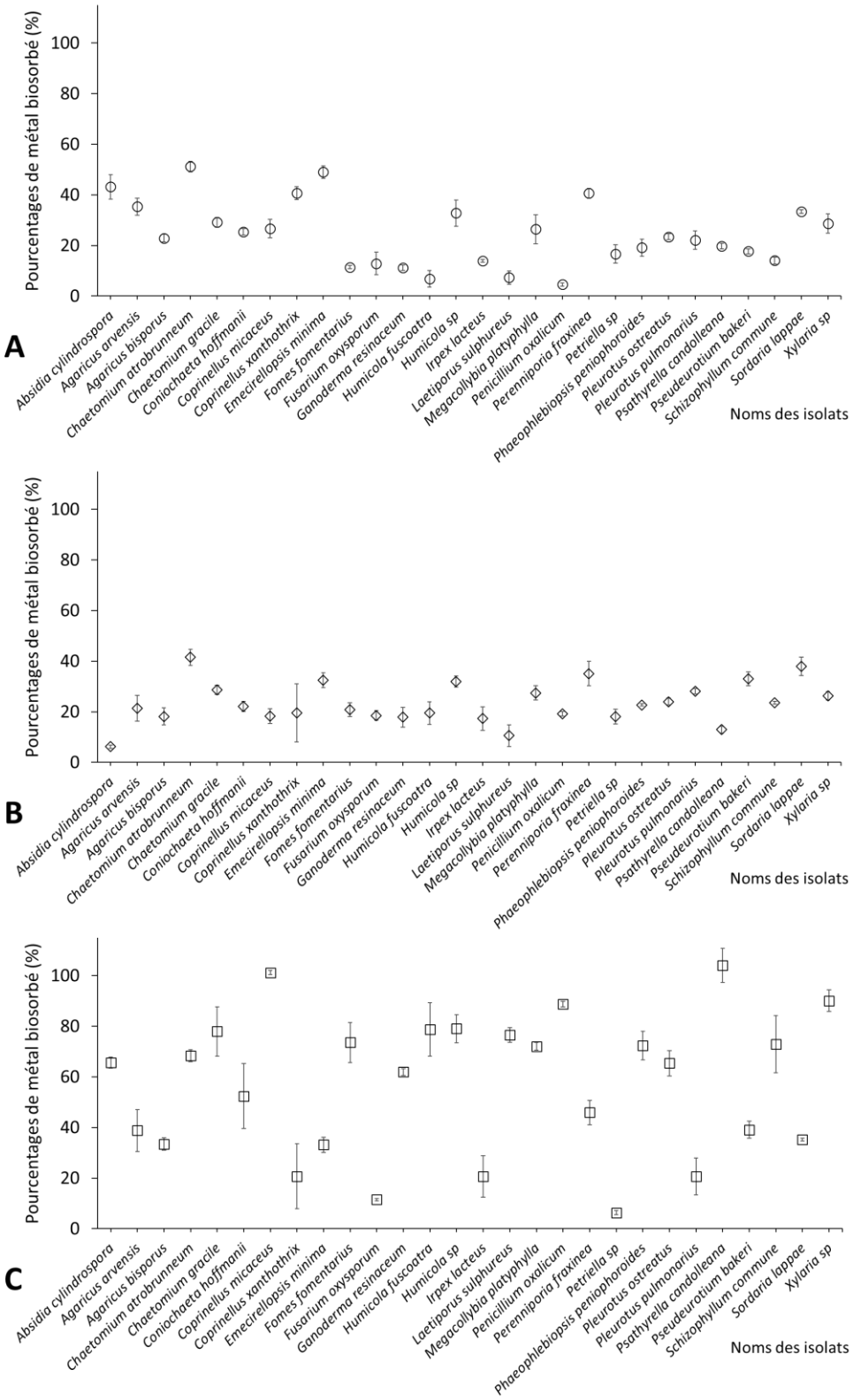


Figure 29 : pourcentages de métal biosorbé après 3 jours d'exposition à 50 mg.L^{-1} de Cd (A), Cu (B), et Pb (C).

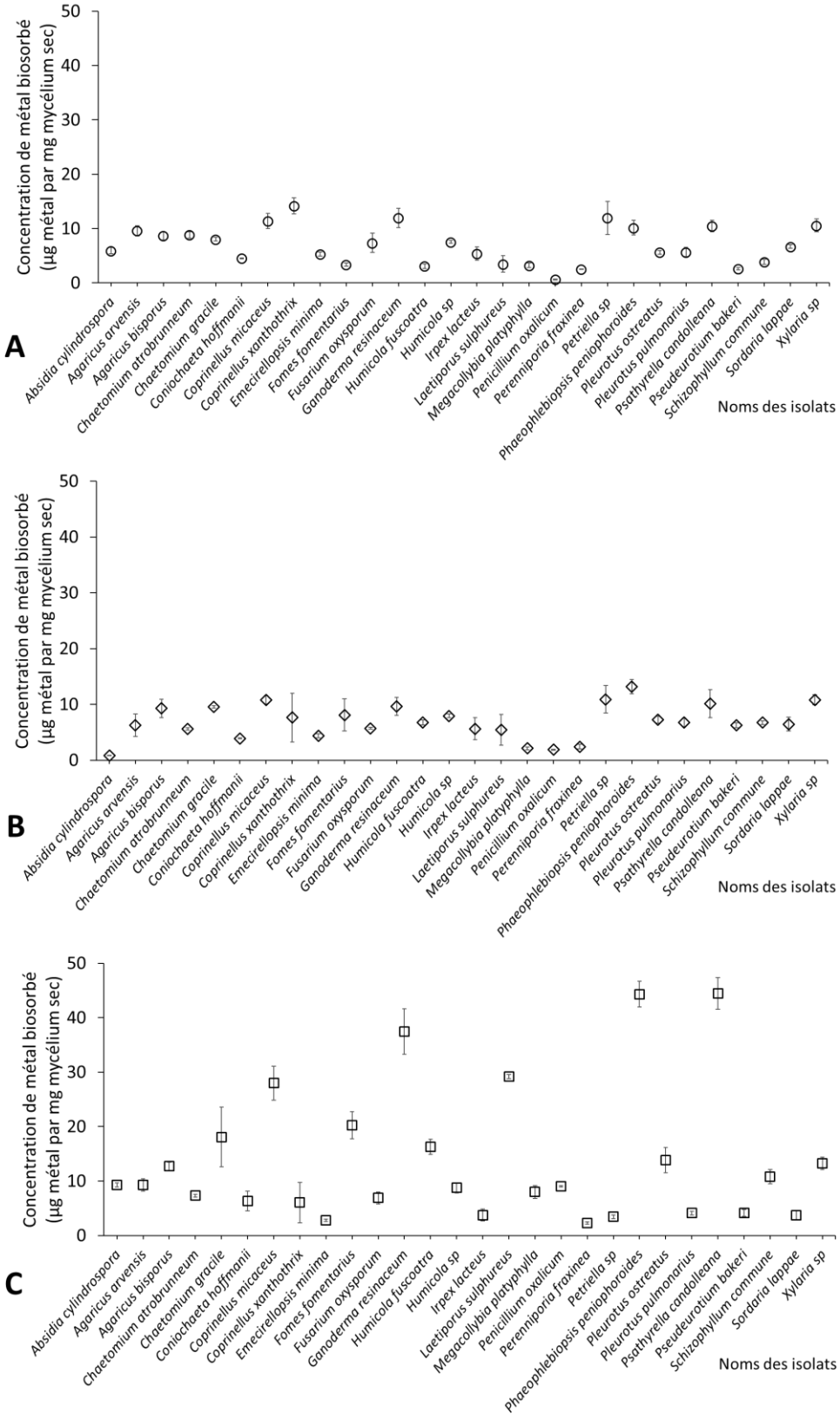


Figure 30 : concentration de métal biosorbé après 3 jours d'exposition à 50 mg.L^{-1} de Cd(A), Cu (B), et Pb (C).

Cas du cadmium

Comme le montre la figure 29, le pourcentage minimum de biosorption est de 5% (*Penicillium oxalicum*) mais 8 isolats biosorbent plus de 30% de Cd : *Chaetomium atrobrunneum* (51%), *Emericellopsis minima* (49%), *Absidia cylindrospora* (43%), *Perenniporia fraxinea* (41%), *Coprinellus xanthothrix* (40%), *Agaricus arvensis* (35%), *Sordaria lappae* (34%), et *Humicola sp* (33%). Parmi les 8 isolats cités précédemment, 7 ont été isolés de sols contaminés (sols 3 et 4, tableau 17 page 99) dont les teneurs en Cd étaient cependant inférieures à la limite de détection. *A. cylindrospora* a été isolée d'un sol dont la teneur en Cd a été évaluée à 12 $mg.kg^{-1}$ (sol 1, tableau 17 page 99). Cette concentration correspond à une anomalie forte liée à une pollution (et non à une anomalie géologique) selon Baize et al. (2007, tableau 4 page 38). Cet isolat a donc pu développer une adaptation à la présence de Cd, ce qui expliquerait ces valeurs importantes de biosorption (presque le double de la moyenne des 28 isolats, (tableau 24 page 140) et une tolérance jusqu'à 1000 $mg.L^{-1}$, chapitre 3, paragraphe II.2, page 121). La concentration au sein du mycélium d'*A. cylindrospora* n'est en revanche pas supérieure à la moyenne. On peut donc attribuer son fort taux de biosorption (en comparaison aux autres isolats) à une production de biomasse supérieure aux autres isolats. L'absorption est supérieure à l'adsorption pour 21 isolats sur les 28 de l'étude (annexe VI, tableau 36, page 247).

Agaricus arvensis a été isolé du sol forestier contenant 1,4 $mg.kg^{-1}$ de Cd (tableau 17, page 99). Les isolats *Humicola sp* et *H. fuscoatra*, très proches d'un point de vue taxonomique, révèlent cependant des comportements différents lorsqu'ils sont confrontés au Cd. En effet, même si ces deux isolats tolèrent 100 $mg.L^{-1}$ de Cd, *Humicola sp* biosorbe jusqu'à 33% de Cd alors que *H. fuscoatra* n'en biosorbe que 7% (figure 29 et tableau 36). Ces deux espèces ont été isolées à partir de sols contaminés par des métaux mais *a priori* sans Cd (sols 3 et 4, tableau 17 page 99). Ces résultats suggèrent que des isolats fongiques sont en mesure de tolérer et de biosorber une substance toxique sans y avoir été préalablement exposés au sein de leur environnement, sous-entendant donc un mécanisme intrinsèque, non induit par l'environnement. Une autre substance toxique a aussi pu promouvoir une réponse non spécifique, induisant une tolérance et/ou la biosorption. Ces 2 isolats étant proches au niveau

taxonomique, ce résultat peut indiquer soit une variation de tolérance interspécifique, soit illustrer l'importance du sol d'origine dans la promotion des mécanismes de tolérance.

Les 2 isolats de *Chaetomium* étudiés ont été isolés à partir d'un sol sans Cd (sol 3, tableau 17 page 99) mais le tolèrent jusqu'à 100 $mg.L^{-1}$ (tableau 18 page 109). Cependant, *C. atrobrunneum* biosorbe 51% de Cd alors que *C. gracile* ne biosorbe que 29%. Les 2 *Coprinellus* ont aussi des profils différents : ils tolèrent tous deux 100 $mg.L^{-1}$ mais *C. xanthothrix* biosorbe 40% et *C. micaceus* seulement 25% de Cd. Les 2 isolats de *Pleurotus* (28 et 23%), ainsi que les 2 isolats d'*Agaricus* (35 et 23%) ont des profils de réponses proches concernant la biosorption du Cd. Ces résultats suggèrent que de nombreuses espèces sont capables de biosorber Cd, même si elles proviennent de milieux non contaminés par ce métal. De plus, les capacités de biosorption peuvent être améliorées par une acclimatation des isolats, comme l'ont montré Zhang et al. (2016) et Li et al. (2017).

De nombreux auteurs ont aussi étudié l'espèce *Pleurotus ostreatus.* Favero et al. (1991) ont révélé que cette espèce pouvait tolérer jusqu'à 150 $mg.L^{-1}$ de Cd et biosorber environ 20 $\mu g.mg^{-1}$. Ces performances sont supérieures à celles présentées ici (10 $mg.L^{-1}$ et 5,3 $\mu g.mg^{-1}$, tableau 18, page 109 et tableau 36 de l'annexe VI, page 247). Cependant, leur protocole d'expérience incluait une période de pré-culture plus longue en milieu exempt de métal par rapport à celle observée au cours de notre étude. Cette pré-culture plus longue permet le développement d'une biomasse de départ plus importante et donc une amélioration des capacités de biosorption. Vimala et Das (2011) ont montré que la biosorption de Cd par *Pleurotus platypus* faisait intervenir des échanges ioniques au niveau membranaire ; ces derniers pourraient être favorisés si la biomasse augmente. D'un autre côté, les performances obtenues par Li et al. (2017) avec *P. ostreatus* étaient moins bonnes que celles présentées ici, même après acclimatation progressive de leur souche au Cd. L'acclimatation améliore les capacités de biosorption, par rapport à une souche non acclimatée, mais leur souche demeure moins efficace que la souche forestière de notre étude ou que la souche citée dans l'étude de Favero (1991). Cette différence intéressante montre que les capacités de biosorption peuvent aussi varier au sein d'une même espèce, en fonction des isolats et que la quantité de biomasse disponible pour la sorption semble plus importante que l'acclimatation. Cependant, les conditions expérimentales différentes entre les études peuvent aussi expliquer ces

observations. Une autre étude publiée par Jiang et al. (2015) montre à la fois la biosorption de Cd par une souche de *Pleurotus cornucopiae* et sa capacité à biodégrader un HAP (le phénanthrène), confirmant le potentiel des champignons dans la prise en charge d'une pollution complexe, comme nous l'avons mentionné avec *A. cylindrospora* et le fluorène (Garon et al. 2004).

Cas du cuivre

Le pourcentage maximum de biosorption du Cu est atteint par *Chaetomium atrobrunneum* (42%). Seulement 5 autres isolats biosorbent plus de 30% de Cu : *Sordaria lappae* (38%), *Perenniporia fraxinea* (35%), *Pseudeurotium bakeri* (33%), *Emericellopsis minima* (33%) et *Humicola sp* (32%). Ces isolats (excepté *P. bakeri*) figurent aussi parmi les plus à même de biosorber Cd. Ils ont tous été isolés à partir de sols contaminés par Cu (100 $mg.kg^{-1}$ pour le sol 4 à 345 $mg.kg^{-1}$ pour le sol 3, tableau 17, page 99). Ces résultats suggèrent que pour Cu, les isolats ayant déjà été mis en contact avec ce toxique sont plus efficaces pour le biosorber. Cependant, les 2 isolats d'*Agaricus* ont été isolés d'un sol forestier au sein duquel la teneur en Cu était de 7 $mg.kg^{-1}$ (tableau 17, page 99), ce qui n'est pas une anomalie selon le tableau 4 (page 38, Baize et al. 2004). Or ces 2 isolats sont parmi les 5 Basidiomycètes qui tolèrent 100 $mg.L^{-1}$ et biosorbent environ 20% du Cu. Des isolats non préalablement exposés à des teneurs croissantes (et potentiellement toxiques) de Cu peuvent donc aussi le biosorber efficacement.

Comme pour le Cd, *Chaetomium atrobrunneum* biosorbe mieux Cu que *C. gracile* (42% contre 29%) (figure 29 et tableau 37 en annexe VI, page 249). Comme avec Cd, *Humicola sp* biosorbe mieux Cu que *Humicola fuscoatra* (32% contre 20%). Les 2 isolats de *Coprinellus* tolèrent 100 $mg.L^{-1}$ de Cu et biosorbent 25 et 28%. Leurs profils sont proches en ce qui concerne Cu. Les 2 isolats de *Pleurotus* (24 et 28%) et les 2 isolats d'*Agaricus* (18 et 21%) montrent aussi des profils proches concernant ce métal, ce qui était déjà le cas concernant Cd.

Fusarium oxysporum, seul isolat capable de tolérer jusqu'à 1000 $mg.L^{-1}$ de Cu, produit 82% de biomasse en milieu liquide (tableau 22). Malgré cette apparente bonne tolérance, ses capacités de biosorption restent faibles et inférieures à la moyenne des isolats (18,5% contre 21,9%) avec une

concentration inférieure à 10 µg.mg^{-1} (tableau 37, annexe VI, page 249). Cet isolat, potentiel phytopathogène, est donc très tolérant à Cu, antifongique utilisé en agriculture, mais ne semble pas pour autant capable de le biosorber davantage que les autres isolats.

Le Cu est un antifongique connu et utilisé depuis longtemps. Vincent et al. (2017) mentionnent notamment un effet de contact ("contact killing"), qui expliquerait en partie ses propriétés. Les ions Cu^{2+} libérés dans le milieu engendrerait des dommages membranaires (plutôt que sur l'ADN) qui aboutiraient à la mort des cellules. Le stress oxydant généré est aussi mentionné comme un élément important de l'activité antifongique du Cu, amplifié par les altérations membranaires sus-citées. Les dommages membranaires peuvent s'exprimer dans notre étude. En effet, des altérations de membranes vont empêcher les réactions de sorption qui nécessitent une membrane cellulaire non altérée. Une adaptation préalable au Cu peut éviter ces altérations, et donc permettre le processus de biosorption. Sazanova et al. (2015) ont étudié la biosorption de Cu par *Aspergillus niger* et *Penicillium citrinum*. Leurs résultats supposent que Cu n'induit pas de production d'acide oxalique (comme c'était le cas pour Cd dans leur étude) et serait donc moins détoxifié. Les lésions membranaires associées au défaut de détoxication pourraient en partie expliquer les valeurs généralement plus faibles de biosorption concernant ce métal. L'acclimatation semble donc, contrairement à Cd, être un facteur plus important que la simple production de biomasse. Par exemple, *A. cylindrospora* produit 91% de biomasse dans nos conditions expérimentales mais ne biosorbe que 6,8% de Cu alors que les isolats cités au début de ce paragraphe comme les plus efficaces ne produisent qu'entre 50 et 60% de biomasse, mais sont issus d'un sol contaminé par Cu et en biosorbent plus de 30%.

Gabriel et al. (2001) ont étudié le potentiel de biosorption du Cu par *Pleurotus ostreatus*. La concentration à l'intérieur du mycélium était de 4,7 µg.mg^{-1} après deux heures d'exposition à la dose de 100 mg.L^{-1}. Notre isolat forestier biosorbe 7,2 µg.mg^{-1} après 3 jours à 50 mg.L^{-1}. Ce temps d'exposition beaucoup plus long a seulement permis de multiplier par 1,5 la concentration de Cu biosorbée. Le maximum de biosorption est ainsi probablement atteint bien avant les 3 jours d'exposition. Un temps plus long ne permet pas forcément d'améliorer la biosorption mais peut potentiellement favoriser la toxicité de Cu vis-à-vis du mycélium. Une étude cinétique permettrait de modéliser l'absorption de Cu

en fonction du temps. On se souvient qu'à l'issue de l'étude préliminaire, la biosorption de Cu par *Absidia cylindrospora* semblait liée à la dose et non au temps d'exposition.

Zotti et al. (2014) ont étudié la biosorption de Cu avec différents isolats issus d'un ancien site industriel contaminé par Cu. Les isolats *Trichoderma harzianum* et *Clonostachys rosea* étaient capables de biosorber jusqu'à 20 $\mu g.mg^{-1}$, soit le double du maximum observé dans notre étude (10 $\mu g.mg^{-1}$) par *Coprinellus micaceus, Chaetomium gracile, Ganoderma resinaceum* et *Petriella sp*, qui proviennent tous de sols contaminés par Cu (sols 3 et 4, tableau 17 page 99). Peu d'isolats issus de sols non contaminés par Cu montrent des résultats similaires de biosorption. *Pleurotus ostreatus, Agaricus bisporus, Fomes fomentarius* proviennent du sol forestier et *Xylaria sp* et *Phaeophlebiopsis peniophoroides* proviennent d'un sol contaminé par des PCB (tableau 17, page 99). Comme pour Cd, des isolats non acclimatés à Cu sont capables de le concentrer dans le mycélium comme des isolats acclimatés, mais les pourcentages de biosorption sont globalement plus faibles que ceux obtenus avec des isolats acclimatés.

Matute et al. (2011) ont observé qu'une supplémentation faible en Cu (de 50 à 100 $mg.kg^{-1}$ de substrat) permettait d'améliorer la production de biomasse. Cette particularité pourrait être employée afin d'améliorer la production de biomasse mais aussi afin d'acclimater les isolats à cet élément. Dans la présente étude, *Ganoderma resinaceum* a été isolé à partir d'un sol contaminé par Cd, Cu et Pb (tableau 17, page 99). Il biosorbe jusqu'à 9,7 $\mu g.mg^{-1}$ de Cu dans son mycélium pour un pourcentage de biosorption de 18%. Cet isolat pourrait aussi être intéressant pour des contaminations mixtes puisqu'il est aussi capable de biosorber Cd (12 $\mu g.mg^{-1}$ et 9%, tableau 36) et Pb (37,5 $\mu g.mg^{-1}$ et 62%, tableau 38 en annexe VI, page 251).

Miersch et al. (2001) ont révélé que la production de thiols par *Mucor racemosus* (Mucoromycota) était augmentée suite à une exposition au Cd et au Cu. Jaeckel et al. (2005) ont montré qu'un stress par le Cd induisait la production de métallothionéines et de phytochélatines par les champignons. La production de tels métabolites peut faire partie d'une stratégie de détoxication qui est peut-être ici mise en œuvre, plutôt que la synthèse d'acide oxalique (Baldrian 2003; Fomina et al. 2003; Glasauer et al. 2013).

Li et al. (2009) ont montré que des biomasses inactivées de champignons étaient capable de biosorber Cu. Il s'agissait de *Bjerkandera sp* (12,1 µg.mg^{-1}), *Cladosporium cladosporioides* (7,7 µg.mg^{-1}) et *Gliomastix murorum* (9,0 µg.mg^{-1}). Les mycéliums avaient été inactivés par le formaldéhyde mais les auteurs ne donnent pas d'informations concernant le pourcentage de biosorption par ces biomasses fongiques. Cependant, le fait que des mycéliums inactivés puissent être efficaces pour la biosorption des métaux est à prendre en compte pour de futures études de bioremédiation.

Cas du plomb

Coprinellus micaceus révèle le meilleur potentiel de biosorption du Pb : il biosorbe 100% du Pb présent dans le milieu. Cet isolat tolère aussi 100 mg.L^{-1} en milieu gélosé. Au total, 22 isolats biosorbent plus de 30% de Pb et 11 biosorbent entre 70 et 90% : *Xylaria sp* (90%), *Penicillium oxalicum* (89%), *Humicola sp* (79%), *Humicola fuscoatra* (79%), *Chaetomium gracile* (78%), *Laetiporus sulphureus* (77%), *Fomes fomentarius* (76%), *Psathyrella candolleana* (74%), *Schizophyllum commune* (73%), *Phaeophlebiopsis peniophoroides* (72%), et *Megacollybia platyphylla* (72%) (figure 29C et tableau 38 en annexe VI, page 251). Parmi ces isolats, *M. platyphylla, L. sulphureus* et *F. fomentarius* proviennent d'un sol forestier dont la teneur en Pb était faible (3,9 mg.kg^{-1}, tableau 17, page 99). Cela montre que des isolats *a priori* non acclimatés semblent être en mesure de biosorber efficacement ce toxique.

Les Basidiomycètes sont connus pour absorber le Pb (García et al. 2009) et semblent plus le concentrer que les Ascomycètes. En effet, le tableau 24 montre que les Basidiomycètes concentrent en moyenne 18,3 µg.mg^{-1} de Pb alors que les Ascomycètes ne concentrent que 9,5 µg.mg^{-1}. Les pourcentages moyens de production de biomasse comparés aux témoins de ces 2 groupes sont pourtant proches (88 et 98%, tableau 21 page 133), tout comme les pourcentages de biosorption moyens (55 et 57%, tableau 22 page 135). En revanche, les Basidiomycètes produisent globalement moins de biomasse : 64 contre 91 mg (tableau 35 en annexe VI, page 245 ; les variations au sein des groupes sont cependant importantes). Ce résultat semble aussi indiquer que des mécanismes différents sont mis en jeu en fonction des groupes taxonomiques.

Chaetomium gracile biosorbe 78% et tolère jusqu'à 10 $mg.L^{-1}$ de Pb en milieu gélosé. *Chaetomium atrobrunneum* biosorbe un peu moins (68%, figure 29C), cependant, cet isolat tolère jusqu'à 100 $mg.L^{-1}$ de Pb (tableau 18) et est aussi capable de biosorber plus de 30% de Cd et Cu (figures 29A et 29B). Son profil est donc potentiellement intéressant pour des pollutions multiples. *Humicola sp* et *H. fuscoatra* biosorbent tous deux 80% de Pb. *Coprinellus micaceus* biosorbe 100% du Pb, alors que *C. xanthothrix* n'en biosorbe que 21%. *Pleurotus ostreatus* biosorbe trois fois plus de Pb que *P. pulmonarius* (65% contre 21%, figure 29C) ; ces deux isolats ne tolèrent que 10 $mg.L^{-1}$ de Pb en milieu gélosé (tableau 18 page 109). Les 2 Agarics montrent des pourcentages de biosorption proches : 33% pour *Agaricus bisporus* et 39% pour *A. arvensis*. Ils tolèrent tous deux jusqu'à 1000 $mg.L^{-1}$de Pb (tableau 18 page 109). Les réponses de tolérance et de biosorption du Pb sont ainsi très variées (figure 29C).

En raison de l'absence de solubilité dans l'eau du sulfate de Pb ($PbSO_4$), un nitrate de Pb ($Pb(NO_3)_2$) a été choisi pour supplémenter le milieu de culture en Pb. D'après Gadd (2008), ce sel pourrait favoriser la production de biomasse et d'acide oxalique par les champignons, en raison de la présence de nitrates. Cette particularité pourrait en partie expliquer la relative bonne tolérance du Pb, la production de biomasse peu altérée (et parfois supérieure au témoin) et le nombre élevé d'isolat (11/28) biosorbant plus de 70% de Pb par rapport aux deux autres éléments testés.

II.2.4.3. Conclusion

La croissance rapide et l'importante production de biomasse d'*A. cylindrospora* (qui demeure la plus rapide et parmi les plus productives des 28 souches de notre étude, tableau 23 et tableau 35 en annexe VI, page 245) permet d'avoir à une grande surface de mycélium. Cela pourrait favoriser les interactions de sorption entre les éléments et les groupements chimiques des structures fongique, ou des métabolites sécrétés dans le milieu. Notre étude confirme, assez logiquement, que la production de biomasse apparaît comme un avantage pour la biosorption des métaux. De plus, les analyses statistiques ont montré que les pourcentages de biosorption de Cd et de Pb (toutes souches confondues), étaient corrélés aux concentrations en métal dans le mycélium ($r = 0,30179$; $p = 0,0053$ pour Cd et $r = 0,58905$; $p < 0,0001$ pour Pb) et que la biomasse (masse sèche) produite après exposition au Cu était corrélée à la

concentration de Cu dans le mycélium ($r = 0,45452$; $p < 0,0001$). Une optimisation de la production de biomasse lors de la phase de pré-culture modifierait probablement nos résultats. Par exemple, une augmentation de la température de croissance pour les espèces thermotolérantes (*Chaetomium gracile, C. atrobrunneum*) améliorerait probablement leurs performances déjà intéressantes. De même, *Agaricus bisporus* tolère bien les 3 métaux étudiés et ses résultats "moyens" de biosorption sont probablement liés à la faible production de biomasse (une des plus faibles des 28 isolats de l'étude). L'amélioration de ce paramètre permettrait donc probablement de faire de cette espèce un bon candidat pour la biosorption des métaux.

Certains isolats semblent plus spécifiques quant à leur capacité de biosorption. Par exemple, *C. micaceus* est capable de biosorber 100% du Pb présent dans le milieu de culture et seulement 26% pour Cd et 18% pour Cu. D'autres sont efficaces pour biosorber plusieurs métaux. Par exemple, *A. cylindrospora* biosorbe 45 % de Cd et 65% de Pb, *P. fraxinea* biosorbe 41% de Cd, 35% de Cu et 46% de Pb. Enfin, *C. atrobrunneum* est capable de biosorber plus de 40% des trois métaux de l'étude (51% pour Cd, 42% pour Cu et 68% pour Pb). Globalement, le Pb est le mieux toléré et le mieux biosorbé des trois métaux : 9 isolats le tolèrent jusqu'à 1000 $mg.L^{-1}$ en milieu gélosé et 13 biosorbent plus de 70% du Pb présent dans le milieu de culture. De plus, les Basidiomycètes semblent capables de plus concentrer Pb que les Ascomycètes (tableau 24 page 140).

L'application de notre protocole aux 28 isolats fongiques en vue d'appréhender leur tolérance et leurs capacités de biosorption de Cd, Cu et Pb révèlent des réponses très variées. Aucune relation évidente n'a été perçue entre la taxonomie et les types de réponses observées, des isolats parfois proches taxonomiquement donnant souvent des réponses différentes. Aucun lien évident n'a été mis en évidence entre le sol d'origine des isolats et leurs capacités de tolérance et de biosorption. Des isolats issus de sols naturels et non contaminés ont montré de bonnes capacités de tolérance et de biosorption des métaux étudiés (par exemple *Pleurotus ostreatus*, isolé du sol forestier, biosorbe 65% de Pb). Cependant, les isolats issus de sols contaminés peuvent donner de meilleurs résultats de tolérance et de pourcentage de métal biosorbé par rapport au métal total présent dans le milieu de culture. Ces résultats soulignent l'intérêt d'investiguer la biodiversité fongique à la recherche d'isolats performants.

II.2.5. Sélection des isolats pour les essais en microcosmes

Dans le but d'évaluer l'influence du développement fongique sur la spéciation minéralogique des métaux, nous avons sélectionné 3 souches suite aux résultats du screening en milieu liquide. Les critères principaux de choix étaient :

- les capacités de biosorption (principalement le pourcentage de métal biosorbé à partir du milieu de culture).

- la tolérance

- la production de biomasse.

Ainsi, ont été sélectionnés les isolats *Absidia cylindrospora*, *Chaetomium atrobrunneum* et *Coprinellus micaceus.* Le tableau 25 regroupe les principaux isolats à hauts potentiels de biosorption parmi lesquels les 3 souches ont été sélectionnées pour la suite de l'étude. Il regroupe ainsi les isolats qui biosorbent plus de 30% de Cd, plus de 30% de Cu et plus de 80% de Pb. Les isolats sélectionnés (en gras dans le tableau) conjuguent à la fois les taux de biosorption les plus élevés, associés aux pourcentages de biomasse les plus élevés et souvent au plus fortes concentrations tolérées. Les autres isolats (*Emericellopsis minima*, *Agaricus arvensis*, *Sordaria lappae*, *Humicola sp*, *Perenniporia fraxinea*, *Pseudeurotium bakeri*, *Penicillium oxalicum* et *Xylaria sp*) n'ont pas été retenus, malgré leurs résultats intéressants, car leur croissance est plus lente que les autres isolats présentant des résultats similaires. De plus, la sélection nous permet d'avoir une bonne représentativité taxonomique, les 3 principaux groupes étant représentés (Ascomycète, Basidiomycètes et Mucoromycota).

Tableau 25 : isolats à haut potentiel de bioremédiation selon des critères de biosorption, tolérance et biomasse.

Métal	Isolats fongiques (% de biosorption)	Critère de biosorption	Biomasse (%)	Tolérance maximum ($mg.L^{-1}$)
Cd	*Emericellopsis minima (49)*	≥ 30%	80	100
	Absidia cylindrospora (43)		**92**	**1000**
	Chaetomium atrobrunneum (43)		**61**	**100**
	Perenniporia fraxinea (41)		70	10
	Agaricus arvensis (35)		66	100
	Sordaria lappae (34)		47	100
	Humicola sp (33)		47	100
Cu	***Chaetomium atrobrunneum (42)***	≥ 30%	**79**	**10**
	Sordaria lappae (38)		57	10
	Perenniporia fraxinea (35)		63	100
	Pseudeurotium bakeri (33)		52	100
Pb	***Coprinellus micaceus (100)***	≥ 80%	**105**	**100**
	Xylaria sp (90)		92	50
	Penicillium oxalicum (89)		87	1000

Absidia cylindrospora (Mucoromycota) est la souche modèle avec laquelle nous avons développé l'essai de biosorption en milieu liquide, elle est également connue pour ses capacités de biodégradation du fluorène (Garon, et al. 2004). L'espèce *Chaetomium atrobrunneum* appartient à l'ordre des Sordariales (Ascomycota) et constitue une souche ubiquiste. Cette souche thermotolérante a un profil particulièrement intéressant. En effet, c'est le seul parmi les 28 isolats de l'étude, à être capable de biosorber plus de 40% de chacun des 3 métaux étudiés. Enfin, *Coprinellus micaceus* (Basidiomycota) est un champignon cosmopolite se situant dans l'ordre des Agaricales. Son profil est surtout intéressant vis-à-vis du Pb.

II.3. Essais en microcosme de sol

Les essais en microcosmes de sol ont pour but d'évaluer une potentielle baisse de mobilité des métaux suite à leur biosorption potentielle par les champignons. Ils ont été réalisés comme décrit au chapitre 2, paragraphe II.3 (page 85).

II.3.1. Caractérisation du sol utilisé pour les essais en microcosme

Le prélèvement de sol a été effectué dans une ancienne zone métallurgique de Caen (14 000, Normandie). D'après les cartes mentionnées dans le chapitre 1 (figures 8, 9 et 10, pages 43, 46 et 49), la région caennaise se situe dans une zone géographique ne montrant pas d'anomalies particulières pour Cd, Cu et Pb. Le sol a été prélevé dans les 10 premiers cm (horizon A, figure 1, page 23), tamisé à 2 mm, puis conservé dans un contenant hermétique. Il a été utilisé pour diverses études du laboratoire dont celle de Baraud et Leleyter (2012). Des paramètres physico-chimiques ainsi que microbiologique ont été mesurés à partir du sol utilisé pour les expériences en microcosmes.

Caractérisation microbiologique

La méthode des suspensions-dilutions (chapitre II, paragraphe I.2, page 73) a permis de quantifier la flore microbienne viable qui s'élève à 6.10^4 UFC.g^{-1} de sol pour les bactéries et à $2{,}5.10^1$ UFC.g^{-1} de sol pour les champignons. La méthode par incorporation directe (chapitre II, paragraphe I.1, page 72) et la méthode des suspensions-dilutions ont de plus permis d'isoler et d'identifier 7 espèces fongiques à partir du sol initial :

- *Aspergillus cejpii,*
- *Botrytrichum piluliferum,*
- *Chaetomidium sp,*
- *Chaetomium bostrychodes,*
- *Eupenicillium sp,*
- *Talaromyces flavus,*
- *Talaromyces intermedius*

La flore endogène est globalement pauvre, ce qui peut être attribué à l'origine du sol (contexte industriel et présence de toxiques) et au mode de conservation (sol séché, conditions non favorable au maintien de la flore). Selon Martin et al. (2008), la présence de contaminants peut induire une diminution de la biomasse et de la diversité de la microflore. On note que plusieurs espèces sont thermotolérantes et donc adaptées à un stress environnemental particulier (*Aspergillus cejpii*, *Botrytrichum piluliferum*, *Talaromyces flavus*). Cette particularité est aussi retrouvée assez souvent chez d'autres espèces du genre *Chaetomium* (Jesenská et al. 1993; Domsch et al. 1995; Mouchacca 2007). On remarque de plus qu'aucune souche sélectionnée pour les essais de bioaugmentation n'a été identifiée à partir du sol utilisé.

Caractérisation physico-chimique

Le tableau 26 présente les résultats obtenus pour les principales caractéristiques du sol pollué utilisé pour les essais en microcosmes de sol (pH, CO_3^{2-}, COT). Ces caractéristiques ont été mesurées comme décrit au chapitre 2, paragraphes II.3.2 (page 87) et III (page 91).

Tableau 26 : caractéristiques du sol pollué utilisé pour les essais en microcosme.

Paramètres		**Sol pollué**
COT (%)	moy	**1,0**
	EC	0,5
CO_3^{2-} (%)	moy	**18**
	EC	2
pH	moy	**8,5**
	EC	0,1

moy : moyenne ; EC : écart-type

D'après le tableau 26, le sol utilisé a un pH de 8,5, une teneur en COT de 1% et une teneur de 18% pour les carbonates. Ce sol est donc modérément calcaire (carbonates entre 5 et 25% pour les sols métropolitains), relativement pauvre en COT (<4%) et relativement alcalin (pH > 7) (Baize 2000; Girard et al. 2010; Hamdoun 2013). L'étude de Baraud et Leleyter (2012) a utilisé un échantillon de sol de même origine (zone industrielle de la périphérie de Caen) et nous retrouvons des valeurs proches concernant le pH et le taux de CO_3^{2-} (respectivement 8,5 et 21%, le COT n'était pas mesuré).

Les résultats de dosage des métaux sont présentés dans le tableau 27. Ils montrent que le sol contient 7,8 mg.kg^{-1} de Cd, 25 mg.kg^{-1} de Cu et 117 mg.kg^{-1} de Pb. Nous retrouvons des valeurs proches de celles mesurées lors de l'étude de Baraud et Leleyter de 2012 pour Cd (5 mg.kg^{-1}) et Cu (24 mg.kg^{-1}). En revanche, notre valeur de Pb est doublée par rapport à cette étude (117 contre 58 mg.kg^{-1}), ce qui peut s'expliquer par la non homogénéité des échantillons ou une contamination ultérieure (lors du stockage).

Tableau 27 : concentrations totales et pourcentages des fractions potentillement mobiles des métaux du sol pollué utilisé pour les essais en microcsomes.

		Métal									
		Cd	**Cu**	**Pb**	**Ca**	**Cr**	**Fe**	**K**	**Mn**	**Ni**	**Zn**
Concentration totale (mg.kg^{-1})	moy	**7,8**	**25,0**	**117**	**122648**	**130**	**50214**	**1874**	**3872**	**32**	**127**
	EC	0,4	0,2	5	5556	2	1568	80	111	11	9
Pourcentage potentiellement mobile (%)	moy	**30**	**37**	**6**	**18**	**30**	**35**	**53**	**25**	**47**	**76**
	EC	1	1	1	1	1	2	2	1	1	34

moy : moyenne ; EC : écart-type

Comparativement au tableau 1 (page 24), les concentrations de Pb, Ca, Cr, Mn et Ni sont supérieures aux moyennes de la croûte terrestre données par Leleyter-Reinert (2017). De plus, nos résultats indiquent que les teneurs totales de Cd, Cu, Pb, Cr et Zn constituent une anomalie selon Baize et al. (2007) (tableau 4, page 38) et même des anomalies fortes pour Cd et Pb. De plus, vu le contexte de prélèvement (ancienne zone métallurgique) et l'absence d'originalité pédologique connue, il s'agit de premiers indices forts en faveur d'une contamination d'origine humaine. Ces valeurs sont de plus supérieures aux intervalles moyens mentionnées par les cartes du Réseau de Mesure de la Qualité des Sols (RMQS) (figures 8 à 10, pages 43, 46 et 49) pour ces métaux, dans la région caennaise et en ex-Basse Normandie. Comparés aux mesures du RMQS, nos résultats montrent aussi des valeurs fortes pour Fe, Ca et K, supérieures aux bornes des intervalles du contexte normand (respectivement 75, >10 et 30 mg.kg^{-1} pour Fe, Ca et K, https://www.gissol.fr/, consulté le 28/09/2018) et très probablement liées

au contexte métallurgique de la zone de prélèvement. Lors de ses travaux de thèse, Saussaye (2012) a étudié des sols normands (pH 7,7 ; $CaCO_3$ 4% COT 1%) et a trouvé des valeurs de 2 ; 10 et 15 $mg.kg^{-1}$ en moyenne respectivement pour Cd, Cu et Pb. Les valeurs de Cu et Pb sont dans la gamme courante selon le tableau 4 (page 38). Cependant, Cd est à la limite basse des anomalies fortes. Nos résultats montrent des concentrations presque 4 fois supérieures à ces données pour Cd, presque 3 fois supérieures pour Cu et presque 8 fois supérieures pour Pb. Nos résultats, comparés aux valeurs du RMQS et de l'étude de Saussaye (2012) montrent donc des teneurs bien supérieures au contexte normand, ce qui est aussi largement en faveur d'une contamination.

Le dosage de la fraction potentiellement mobile (tableau 27, page 155) révèle que 30% de Cd, 37% de Cu et 6% de Pb sont potentiellement mobiles. Ces résultats sont inférieurs aux valeurs de l'étude de Baraud et Leleyter (2012) qui estimait environ 80% de Cd, 100% de Cu et 100% de Pb mobiles, avec la même méthode d'extraction. Ces différences de pourcentages pourraient s'expliquer soit par une variation de la teneur totale (qui diminuerait par volatilisation par exemple, mais semble peu probable), soit par une redistribution et/ou changement de spéciation vers des fractions moins mobiles (effet "vieillissement") soit les deux. La non homogénéité des échantillons étudiés est aussi une explication plausible.

L'étude de Hamdoun et al. (2015) compare des méthodes d'extractions simples et séquentielles afin d'évaluer la mobilité des métaux sur des sédiments marins. Un des échantillons de sédiment de cette étude a été prélevé dans un port en activité et a des caractéristiques proches de notre sol : pH de 8,5, taux de carbonates de 21% et COT de 2%. Cu et Pb sont mesurés respectivement à 62 et 42 $mg.kg^{-1}$ (Cd n'est pas mesuré dans cette étude). Les auteurs évaluent à près de 70% le Cu potentiellement mobile avec la même méthode d'extraction séquentielle que celle utilisée pour nos travaux. Cette valeur atteint 35% pour Pb. Nos résultats montrent des proportions inférieures pour ces 2 métaux malgré des paramètres proches. D'autres paramètres sont donc probablement en jeu (potentiel d'oxydoréduction par exemple).

La figure 31 montre les répartitions des métaux au sein des différentes fractions minéralogiques du sol utilisé. Les proportions liées aux fractions hydrosolubles et échangeables sont négligeables pour

tous les métaux, dont Cd, Cu et Pb. Ces fractions très labiles ont pu être lessivées dans l'environnement avant le prélèvement. On remarque, en revanche, que les fractions acido-solubles et réductibles sont les plus représentées. L'importance non négligeable du taux de carbonates (18%) peut expliquer l'importance de la fraction acido-soluble. En effet, les carbonates sont des éléments importants du pouvoir tampon du sol et des ligands potentiels des métaux. Ca est classiquement retrouvé principalement avec la fraction carbonatée, ce qui est lié à la nature modérément calcaire du sol dont la calcite ($CaCO_3$) est un composé fréquent (Saussaye 2012). Ce résultat est aussi en accord avec Leleyter (1999) qui trouve Ca principalement lié à la fraction carbonatée sur des sédiments de rivière modérément riches en carbonates (de 10 à 20%). De même, les fractions carbonatées de K et Zn significatives sont classiques dans ces conditions. En effet, K peut facilement s'échanger avec Ca et est donc retrouvé fortement lié à la fraction carbonatée (Girard et al. 2010). Hamdoun et al (2015) retrouve aussi Zn principalement avec les fractions acido-solubles et réductibles pour le sédiment dont les caractéristiques de pH, carbonates et COT sont proches des nôtres. La richesse en Fe du sol peut expliquer la forte proportion des fractions réductibles (que l'on retrouve aussi pour Ni, Mn et Cr). En effet, les oxydes de Fe sont les principales espèces chimiques retrouvées pour cet élément (en condition oxique), or les oxydes de Fe sont des sites fréquents de fixations des éléments métalliques. La forte présence de Fe a donc probablement favorisé ce type d'interaction. Dans son ouvrage, Alloway (2013) indique que pour un pH de 8,5 les oxydes de Fe et de Mn ont une charge électrique nulle ou négative, ce qui favorise la liaison des cations métalliques, ce qui semble cohérent avec nos résultats. Cette richesse en Fe est elle-même très probablement liée au contexte de prélèvement (ancienne zone métallurgique) (Baraud et Leleyter 2012). Cette répartition est, d'autre part, cohérente avec celles obtenues par Leleyter (1999) et Leleyter et al. (2012) pour des sols comparables (en terme de pH, COT, $CaCO_3$).

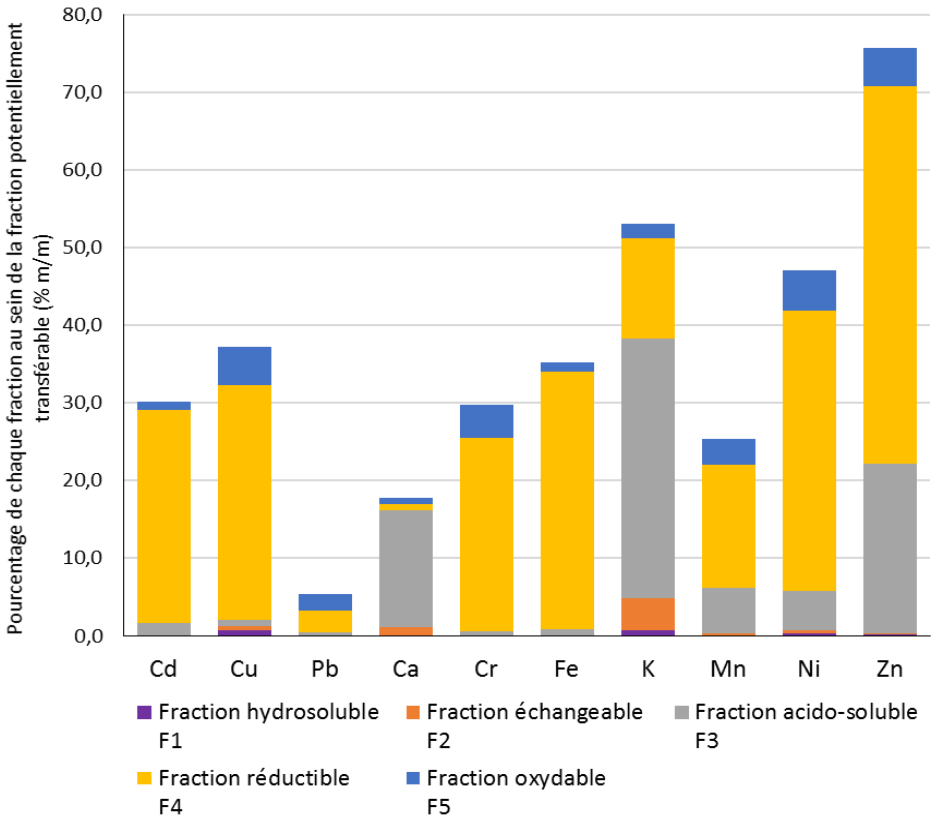


Figure 31 : spéciations minéralogiques des métaux dans le sol contaminé utilisé pour les essais en microcosme.

Les fractions hydrosolubles et échangeables de Cd sont négligeables. La fraction acido-soluble de Cd est faible (2%), contrairement à d'autres métaux comme Ca par exemple (15%), ce qui peut s'expliquer par la faible affinité de Cd pour cette fraction. Le taux faible de COT peut expliquer en partie la faible liaison de Cd à la fraction oxydable (qui comprend la fraction liée à la matière organique entre autres). Nous retrouvons ici principalement une liaison avec les oxydes (26%), probablement favorisée par la richesse en Fe de l'échantillon. L'étude de Baraud et Leleyter (2012) retrouvait une proportion de 60% liée à cette fraction pour un échantillon de sol aux caractéristiques proches (pH de 8,5 et taux de carbonates de 21%). Une telle répartition de Cd n'est donc pas surprenante

La majorité du Cu mobile est lié à la fraction réductible (30%). La fraction oxydable retient 5% du Cu labile. Les autres fractions retiennent moins de 1% du Cu labile. Ces résultats sont en accord avec Hamdoun et al. (2015), Leleyter (2017) et Carrillo-González et al. (2006) selon lesquels Cu se lie préférentiellement aux fractions réductibles et oxydables dans les sols et les sédiments. Cu présente aussi une faible affinité pour la fraction acido-soluble. En revanche, si Baraud et Leleyter (2012) retrouvait

bien, pour le même sol, une fraction réductible à hauteur de 45%, la fraction oxydable représentait environ 45% environ, contre 5% ici. Cette différence pourrait être le signe d'une évolution dans le temps de la distribution. Malgré tout, ces 2 fractions restent les fractions majoritaires dans lesquelles se répartit Cu, ce qui reste cohérent avec la littérature.

Pb est peu mobile (6%, tableau 27, page 155) dans nos conditions expérimentales et la fraction mobile se répartit principalement entre fractions réductible et oxydable, comme ce qui était déjà observé dans l'étude de Baraud et Leleyter (2012) sur des échantillons du même sol. En revanche, cette dernière relevait 90% de Pb associé à la fraction oxydable (contre 4% ici) tandis que la fraction réductible est comparable dans les 2 cas (3 à 5%). Comme pour Cu, les différences semblent donc principalement liées à la fraction oxydable et donc probablement, entre autres, à l'évolution de la matière organique (quantité et nature des composés) et des conditions rédox. Cependant, les résultats, déjà différents, concernant la teneur totale doivent nous faire considérer cette comparaison avec prudence pour Pb.

Les différences par rapport à l'études de Baraud et Leleyter (2012) montrent une mobilité légèrement plus faible de Cd, Cu et Pb dans notre échantillon initial et semblent s'expliquer par une différence d'homogénéité entre les échantillons et/ou un effet vieillissement du sol. Les répartitions de ces métaux au sein des différentes fractions minéralogiques sont cependant cohérentes avec celles évoquées par cette étude, ou celle de Hamdoun et al. (2015), et de Leleyter (1999) qui a étudié 37 échantillons représentatifs d'une diversité de type de sols ou sédiments (riches en matière organique, riches en carbonates, riches en oxydes et enfin pauvres en chacune de ces fractions).

II.3.2. Evolution des microcosmes

Suivi microbiologique

La figure 32 illustre les microcosmes au début de l'expérience (J0) et le développement fongique à l'issue des 20 jours de l'essai (J20) pour le microcosme témoin (sans ajout de nutriments, ni de champignons, figures 32 AJ0 et AJ20), le microcosme biostimulé (ajout de milieu culture uniquement, figures 32 BJ0 et BJ20) et le microcosme bioaugmenté avec *Absidia cylindrospora* (figures 32 CJ0,

CJ15, DJ0 et DJ20). Des photographies similaires montrant le développement fongique à la surface des microcosmes bioaugmentés avec les autres isolats (*Chaetomium atrobrunneum* et *Coprinellus micaceus*) sont présentées dans l'annexe VII (page 253). La figure 32 montre que le développement fongique est favorisé par les deux traitements en comparaison au microcosme témoin, pour lequel le développement fongique est présent, mais visuellement très faible. Les filaments y sont très clairsemés et peu nombreux. Ce développement est attribué à la microfonge endogène du sol utilisé. L'apparente pauvreté de cette flore était attendue et est sans doute due aux contaminations et aux méthodes de conservation de ce sol.

Pour le microcosme témoin, l'apport d'eau lors de la mise en place de l'expérience a permis une reprise faible de quelques espèces peu exigeantes. En revanche, un simple apport de minéraux essentiels permet un développement plus important et des filaments mycéliens sont visibles en surface du microcosme biostimulé même si ces apports de minéraux sont négligeables (< 0,01% m/m pour tous les éléments concernés) par rapport à leur teneur totale dans le sol (annexe VIII, page 255). Des amas de filaments relativement denses apparaissent à plusieurs endroits du microcosme bioaugmenté avec *A. cylindrospora*, dès le 15ème jour de l'expérience (figure 32 CJ15). Le développement fongique de surface de ce microcosme devient conséquent par rapport aux 2 autres et recouvre presque entièrement la surface du microcosme, à la fin de l'expérience (figures 32 DJ20 et EJ20).

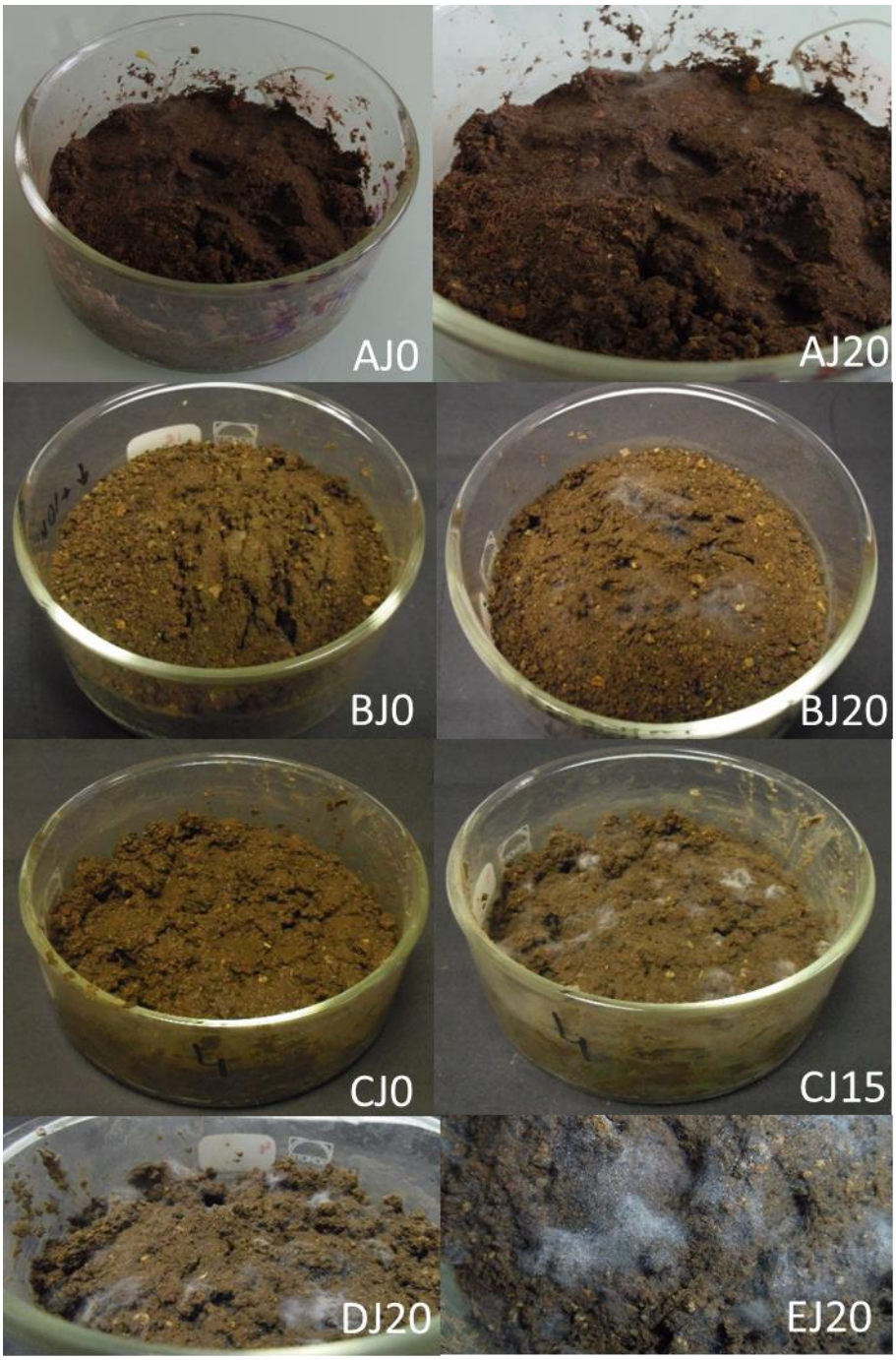


Figure 32 : photographies des microcosmes au début de l'essai (J0) et à la fin de l'expérience (J20) montrant le développement fongique pour le microcosme témoin (AJ0 et AJ20), le microcosme biostimulé (BJ0 et BJ20) et le microcosme bioaugmenté avec A. cylindrospora (CJ0 et CJ15). Des détails de ce dernier microcosme en fin d'expérience sont présentés (DJ20 et EJ20).

Les filaments denses retrouvés sur le microcosme bioaugmenté avec *A. cylindrospora* ont été isolés et identifiés comme appartenant à cette espèce (identifications morphologique et moléculaire). Des périthèces de *Chaetomium sp* ont aussi été isolés de ce microcosme. Seuls ces deux types de mycéliums étaient visibles sur ce microcosme. Des prélèvements ont été réalisés afin d'isoler les espèces visibles en surface de tous les microcosmes. Les résultats de cette approche culturale montrent que les espèces *Actinomucor elegans*, *Geomyces pannorum* et *Papulospora immersa* ont été retrouvées dans les microcosmes bioaugmentés, excepté celui réalisé avec *A. cylindrospora* (tableau 28). Les périthèces de *Chaetomium sp* ont aussi été retrouvés en surface du microcosme biostimulé. Deux mycéliums, fréquemment retrouvés, n'ont pas pu être identifiés précisément. Les mycéliums des autres isolats utilisés pour la bioaugmentation n'ont pas été retrouvés en surface des microcosmes. Ils semblent donc moins aptes qu'*A. cylindrospora* à coloniser le microcosme. De plus, les mycéliums retrouvés en surface semblent différents en fonction de l'isolat utilisé pour la bioaugmentation. La bioaugmentation semble donc bien avoir un impact sur la flore fongique endogène.

Tableau 28 : espèces fongiques identifiées en surface des microcosmes après les essais de bioaugmentation ou de biostimulation (20 jours).

Essai en microcosme	Mycéliums de surface isolés et identifiés à J20
Bioaugmentation avec *Absidia cylindrospora*	*Absidia cylindrospora* *Chaetomium sp*
Bioaugmentation avec *Chaetomium atrobrunneum*	*Actinomucor elegans* *Botryotrichum piluliferum* *Geomyces pannorum* *Papulospora immersa*
Bioaugmentation avec *Coprinellus micaceus*	*Actinomucor elegans* *Geomyces pannorum* *Papulospora immersa*
Biostimulation	*Chaetomium sp*

Des PCR réalisées à partir des ADN totaux extraits des microcosmes à la fin de l'expérience ont été réalisées pour les essais avec *A. cylindrospora* (figure 33). La révélation de ces PCR confirme que

le traitement de biostimulation et de bioaugmentation avec *A. cylindrospora* favorise le développement fongique. En effet, la figure 33 montre que le sol pollué non traité ne révèle aucun amplicon, signe d'une teneur faible (ou insuffisante pour permettre une extraction et une amplification avec les méthodes employées) en ADN fongique. Les microcosmes témoins et biostimulés ne révèlent aucun amplicon à J0 mais la présence d'ADN fongique est visible à J20. La bande est cependant extrêmement faible pour le microcosme témoin. Ce résultat suggère une réactivation faible des espèces fongiques endogènes du microcosme témoin et une réactivation bien plus efficace due à l'ajout de milieu de culture (nutriments facilement biodisponibles) pour le microcosme biostimulé. Le microcosme bioaugmenté avec *A. cylindrospora* révèle une bonne amplification de l'ADN à J0 et J20. On note que la bande est plus intense à J20, ce qui suggère une meilleure amplification, probablement due à une plus grande quantité d'ADN. Ces résultats sont en accord avec l'observation macroscopique des microcosmes (figure 32) mais la PCR n'étant pas une méthode quantitative, ces interprétations doivent rester prudentes et ne sont valables que pour des extractions d'ADN de qualité similaire (ce qui est le cas ici, chapitre 2, paragraphe I.4.2, page 76). Après 20 jours, plusieurs bandes sont visibles pour le microcosme biostimulé. La bande la plus intense est cependant à la même hauteur que la bande à J20 du microcosme témoin. On peut donc supposer qu'il s'agit des mêmes espèces que celles de la microfonge endogène du sol pollué qui sont réactivées et retrouvées dans ce microcosme. La bande est plus intense pour le microcosme bioaugmenté à J20 que pour les autres. Elle correspond en taille à la bande témoin obtenue avec de l'ADN pur d'*A. cylindrospora*. Les autres bandes ne sont pas retrouvées avec ce microcosme. Il est probable que cet isolat à croissance rapide, dont une biomasse relativement importante est apportée (comparée aux biomasses potentielles de la fonge endogène), prenne les autres espèces de vitesse et inhibe leur développement. La bioaugmentation semble avoir une influence non négligeable sur les populations fongiques endogènes.

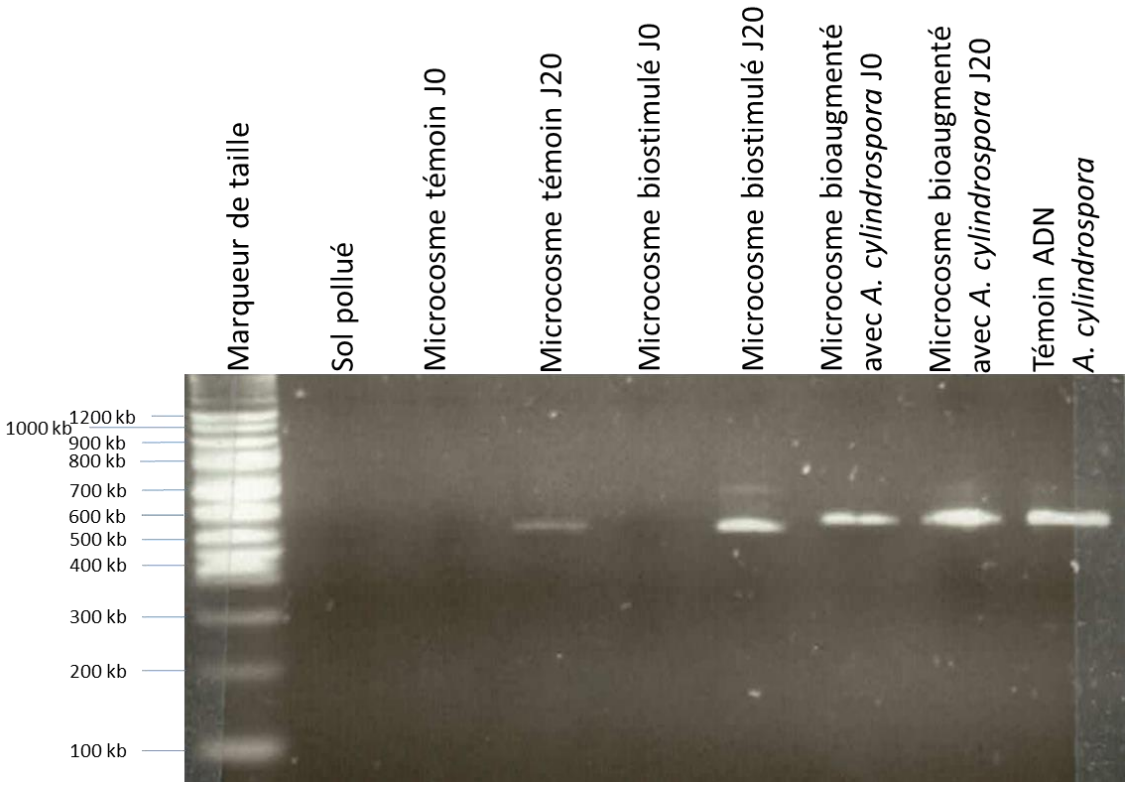


Figure 33 : photographie des amplicons obtenus par PCR à partir des ADN totaux des microcosmes (J0 et J20) témoin, biostimulé et bioaugmenté par Absidia cylindrospora après électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

Les ADN totaux extraits à partir de ces microcosmes ont été conservés et serviront à une étude globale des populations fongiques par une approche moléculaire (métagénomique) au cours d'un travail complémentaire au laboratoire.

Suivi physico-chimique

Afin d'appréhender l'influence des différents traitements sur le sol pollué, des mesures de plusieurs paramètres ont été réalisés (COT, CO_3^{2-} et pH) à l'issue des 20 jours de développement des microcosmes et complètent les mesures concernant les métaux. Les résultats sont donnés dans le tableau 29.

Tableau 29 : valeurs des principaux paramètres physico-chimiques mesurés au sein des microcosmes.

Paramètres		Sol pollué	Microcosme témoin	Microcosme biostimulé	Microcosmes bioaugmentés		
					Absidia cylindrospora	***Chaetomium atrobrunneum***	***Coprinellus micaceus***
COT (%)	moy	**0,9**	**0,8**	**1,9**	**2,2**	**1,9**	**1,5**
	EC	0,5	0,5	0,4	0,7	0,8	0,7
CO_3^{2-} (%)	moy	**18,2**	**18,7**	**8,6**	**18,6**	**13,5**	**15,0**
	EC	2,0	0,3	1,3	0,5	4,3	3,2
pH	moy	**8,5**	**8,3**	**7,9**	**8,2**	**8,0**	**8,3**
	EC	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Moy : moyenne ; EC : écart-type

Les valeurs de COT, CO_3^{2-} et de pH ne sont pas influencées par la mise en place de l'expérience; en effet, ces valeurs sont comparables pour le sol pollué et le microcosme témoin (respectivement 0,9 et 0,8% pour le COT, 18,2 et 18,7% pour CO_3^{2-} et 8,5 et 8,3 pour le pH).

A l'issue des 20 jours, le COT tend à augmenter et est doublé pour les microcosmes biostimulés et bioaugmentés, passant de 0,8 à 1,9% pour le microcosme biostimulé et à 2,2; 1,9 et 1,5% pour les microcosmes bioaugmentés avec *A. cylindrospora, C. atrobrunneum* et *C. micaceus* (tableau 29). Cette augmentation est attribuée, pour la plus grande part, au développement fongique, seule source possible de production de carbone. Cette augmentation du COT pour les microcosmes biostimulés et bioaugmentés est donc un argument fort du développement fongique, cohérent avec les observations des microcosmes citées précédemment.

Par rapport au témoin (18,7%), la teneur en carbonates est diminuée pour le microcosme biostimulé (8,6%) et dans une moindre mesure, pour deux des microcosmes bioaugmentés (13,5% avec *Chaetomium atrobrunneum* et 15,0% avec *Coprinellus micaceus*). La bioaugmentation avec *A. cylindrospora* ne montre pas d'influence sur ce paramètre (18,6%). Les résultats suggèrent que les carbonates sont plus diminués lors de la biostimulation que lors des bioaugmentations. On pourrait supposer que les sécrétions acides par les champignons sont plus importantes dans ces conditions, (ce qui est en accord avec la relative baisse du pH), mais cette baisse de pH est modérée et reste trop faible pour expliquer la baisse importante du taux de carbonates. Les résultats des 3 bioaugmentations ne montrent de plus pas de cohérence entre cette baisse de pH et celle des carbonates.

Les résultats concernant l'évolution du pH montrent que ce paramètre diminue peu quel que soit le traitement. Il passe ainsi de 8,3 pour le microcosme témoin à 7,9 après biostimulation, 8,2 ; 8,0 et 8,3 après bioaugmentation avec *Absidia cylindrospora, Chaetomium atrobrunneum* et *Coprinellus micaceus*. Même si ces variations ne sont pas statistiquement significatives ($p > 0,05$ pour chaque microcosme), ces résultats suggèrent une tendance à la baisse qui est possiblement due au développement fongique (respiration cellulaire, métabolisation des sucres, production d'acides organiques) dans un contexte de matrice contaminée (Arwidsson et al. 2010; Kelly 2016). Cette tendance était attendue compte tenu des résultats obtenus au cours de l'étude préliminaire en milieu liquide notamment. Elle est peut-être contrebalancée par le pouvoir tampon du sol, notamment grâce aux carbonates (Girard et al. 2010; Baize et al. 2011) et le temps de développement relativement court des microcosmes (seulement 20 jours), ne permettant pas une influence marquée sur ce paramètre. De plus, Smits (2009) indique que l'acide oxalique fongique doit être sécrété à proximité des minéraux (moins de 10 µm) pour avoir une influence sur leur minéralisation. Les acides organiques potentiellement sécrétés agissent donc à un niveau très local et sont donc possiblement sécrétés en faibles quantités, ce qui peut ne pas influencer le pH global de la matrice. Cette analyse est compatible avec nos résultats.

En résumé, les procédés de biostimulation et de bioaugmentation augmentent le COT, diminuent la teneur en carbonates (sauf *A. cylindrospora*) et influencent peu le pH global. Les valeurs des paramètres pH et COT sont comparables entre les microcosmes biostimulés et bioaugmentés. La biostimulation tend à réduire la teneur en carbonate de façon plus marquée.

Evolution des spéciations minéralogiques des métaux

Les microcosmes témoins, biostimulés et bioaugmentés avec *Absidia cylindrospora, Chaetomium atrobrunneum* et *Coprinellus micaceus* ont été soumis au protocole d'extractions séquentielles afin de quantifier la répartition des métaux dans les différentes fractions minéralogiques labiles du sol (hydrosoluble, échangeable, acido-soluble, réductible et oxydable) selon le protocole de Leleyter et Probst publié en 1999 (chapitre 2, paragraphe III.2, page 92). L'objectif de ces extractions est de mettre en évidence l'influence de la croissance fongique sur les spéciations minéralogiques des

métaux. Il s'agit en particulier de déterminer si cette possible influence se traduit par une augmentation ou une diminution de la fraction labile, dans un but de gestion du risque toxique. L'approche séquentielle permet aussi d'émettre des hypothèses sur les possibles transferts d'éléments au sein des différentes fractions minéralogiques. Les proportions de métal potentiellement mobile sont présentées dans le tableau 30 en en $mg.kg^{-1}$. Le tableau 31 présente les valeurs en pourcentages des teneurs totales.

Tableau 30 : évolution de la fraction potentiellement mobile en $mg.kg^{-1}$.

Métal		Microcosme témoin	Microcosme biostimulé	Microcosmes bioaugmentés		
				Absidia cylindrospora	***Chaetomium atrobrunneum***	***Coprinellus micaceus***
Cd	**moy**	**2,3**	**2,2**	**2,1**	**2,2**	**2,3**
($mg.kg^{-1}$)	EC	<0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
Cu	**moy**	**9,3**	**9,5**	**7,6**	**10,0**	**10,0**
($mg.kg^{-1}$)	EC	1,5	3,7	0,6	1,3	0,8
Pb	**moy**	**6,3**	**5,4**	**11,6**	**13,1**	**7,9**
($mg.kg^{-1}$)	EC	0,7	1,4	3,4	4,9	1,3
Ca	**moy**	**21824**	**23388**	**26504**	**37845**	**38700**
($mg.kg^{-1}$)	EC	860	421	1339	533	2063
Cr	**moy**	**38,6**	**37,1**	**46,6**	**51,2**	**61,2**
($mg.kg^{-1}$)	EC	1,2	0,4	3,3	1,3	4,2
Fe	**moy**	**17686**	**17541**	**16978**	**27159**	**27559**
($mg.kg^{-1}$)	EC	990	1304	920	2510	3067
Mn	**moy**	**981**	**882**	**1005**	**1261**	**1450**
($mg.kg^{-1}$)	EC	21	21	46	105	72
Ni	**moy**	**15,1**	**15,1**	**17,2**	**15,6**	**17,5**
($mg.kg^{-1}$)	EC	0,2	0,6	0,5	0,5	1,1
Zn	**moy**	**96,1**	**65,8**	**55,4**	**54,3**	**49,8**
($mg.kg^{-1}$)	EC	43,1	12,5	1,9	1,7	3,0

moy : moyenne
EC : Ecart-type

Tableau 31 : évolution de la fraction potentiellement mobile en pourcentage des teneurs totales.

Métal		Microcosme témoin	Microcosme biostimulé	Microcosmes bioaugmentés		
				Absidia cylindrospora	*Chaetomium atrobrunneum*	*Coprinellus micaceus*
Cd (%)	**moy**	**30**	**28**	**27**	**29**	**29**
	EC	1	2	1	4	3
Cu (%)	**moy**	**37**	**38**	**30**	**40**	**40**
	EC	6	5	2	7	3
Pb (%)	**moy**	**5**	**5**	**10**	**11**	**7**
	EC	1	1	10	4	1
Ca (%)	**moy**	**18**	**19**	**22**	**31**	**32**
	EC	1	1	2	1	2
Cr (%)	**moy**	**30**	**28**	**36**	**39**	**47**
	EC	1	1	3	8	3
Fe (%)	**moy**	**35**	**35**	**34**	**54**	**55**
	EC	2	3	2	8	6
Mn (%)	**moy**	**25**	**23**	**26**	**33**	**37**
	EC	1	1	2	4	2
Ni (%)	**moy**	**47**	**48**	**54**	**49**	**55**
	EC	1	2	2	2	4
Zn (%)	**moy**	**76**	**52**	**44**	**43**	**40**
	EC	34	10	1	1	2

moy : moyenne ; EC : écart-type
Les concentrations totales après minéralisation à l'eau régale du sol pollué utilisé sont de 7,8 en $mg.kg^{-1}$ pour Cd, 25,0 $mg.kg^{-1}$ pour Cu et 117,0 $mg.kg^{-1}$ pour Pb.

Cas du Cadmium

Concernant le Cd, le pourcentage potentiellement mobile du microcosme témoin est de 30% (tableau 31, figure 34). Cd est un peu moins mobile pour les microcosmes bioaugmentés avec *Absidia cylindrospora* (27%) et *Chaetomium atrobrunneum* (28%) mais reste inchangé avec *Coprinellus micaceus* (30%) (tableau 31). Seule la diminution due à *Absidia cylindrospora* est statistiquement significative ($p = 0,028$) comparée au témoin ($p > 0,05$ pour les autres conditions).

La figure 34 montre la répartition (en pourcentage) du Cd potentiellement mobile au sein des différentes fractions minéralogiques des microcosmes. Les moyennes des valeurs (et les écarts-types) de chaque fraction sont données dans le tableau 40 de l'annexe IX (page 258).

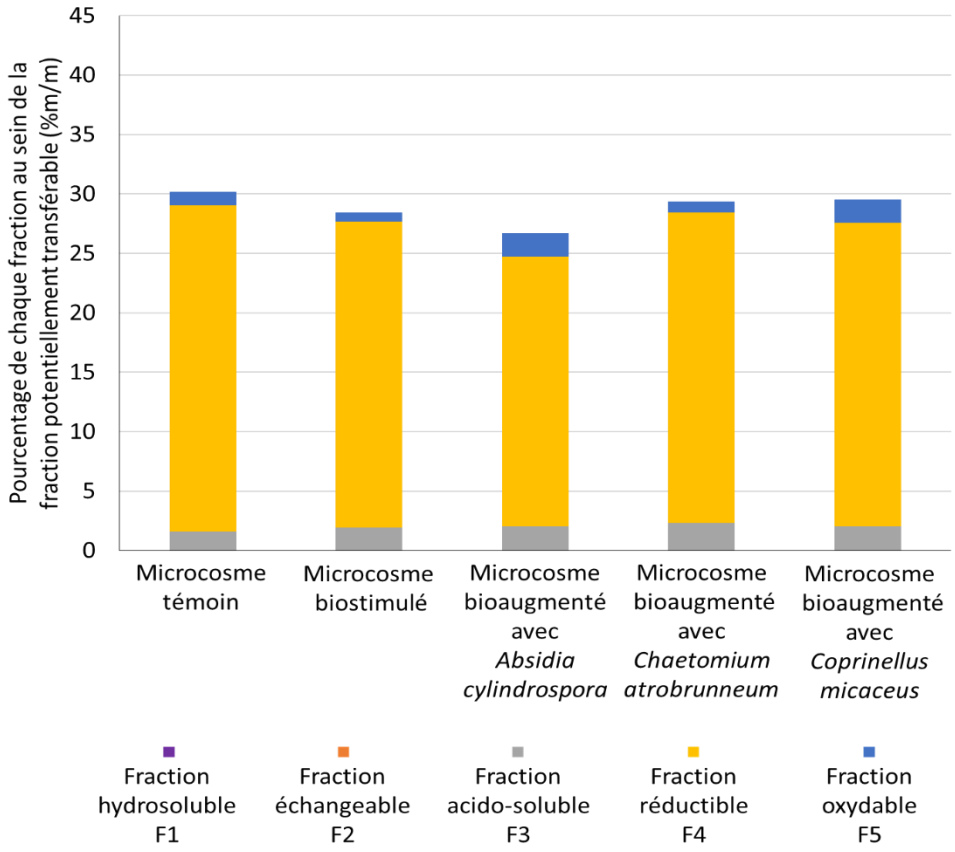


Figure 34 : répartition de Cd au sein des différentes fractions labiles des sols des microcosmes.

D'après la figure 34, il semble que la bioaugmentation avec *A. cylindrospora* ait la plus grande influence et que les microcosmes biostimulés et bioaugmentés avec *C. atrobrunneum* et *C. micaceus* apportent peu de modification à cette répartition. Cependant, les variations sont faibles et n'illustrent que des tendances à confirmer.

La bioaugmentation avec *A. cylindrospora* semble induire un transfert (faible) de Cd depuis la fraction réductible (qui diminue de 5%) vers la fraction oxydable (+1%) et vers la fraction résiduelle. Il est aussi possible qu'une évaporation, à partir de la fraction mobile, ait lieu suite à l'influence du développement fongique (ce qui semble compatible avec la diminution de la teneur labile totale, tableau 30) et peut donc aussi conduire à la baisse du pourcentage de cette fraction. L'influence du développement fongique sur le Cd lié aux fractions réductibles et oxydables, liée aux modifications de potentiel rédox pouvant être induites par les micro-organismes, est mentionnée par Kertesz and Frossard (2015) et Peng (2018). Ces résultats suggèrent donc que le Cd est bien biosorbé par le mycélium

(augmentation de la liaison à la matière organique) et que le développement du mycélium permet une très légère diminution du pourcentage de Cd potentiellement mobile. Ces transferts sont plus importants avec *A. cylindrospora* qu'avec les deux autres isolats (mais restent très faibles). Ces tendances sont donc à confirmer.

D'un point de vue métabolique, Gadd (1994) et Kubicek et al. (2011) évoquent les acides organiques sécrétés par le mycélium (dus au métabolisme fongique et aux processus de détoxication induit) capables d'attaquer la fraction carbonatée et la surface des argiles. Chen (2015) a montré qu'un stress par Cd pouvait induire la sécrétion d'acide oxalique chez *Phanerochaete chrysosporium*. Les cations métalliques liés à ces fractions seraient alors libérés et complexés. Si l'on admet que le complexe est réabsorbé par le mycélium, cela peut augmenter la fraction oxydable à laquelle est lié le métal. Nous n'observons cependant pas de diminution de la fraction carbonatée pour Cd. Cette hypothèse est donc peu compatible avec nos résultats. Les variations obsérvées ici sont cependant trop faibles pour pouvoir conclure.

Une autre hypothèse serait une sécrétion de métallothionéines ou de sidérophores. Ces molécules, riches en groupements sulfhydriles (réducteurs), seraient alors capables de capter le Cd lié à la fraction réductible. Le cation métallique (lié au métabolite) serait alors biosorbé par le mycélium (Renshaw 2002, Jaekel et al. 2005). Cette hypothèse permet d'expliquer la diminution de Cd lié à la fraction réductible et l'augmentation de Cd lié à la fraction oxydable. En résumé, nos résultats suggèrent que le métabolisme d'*A. cylindrospora* est capable de capter le Cd depuis la fraction réductible et d'induire un transfert vers la fraction oxydable, signe de la biosorption par le mycélium. La mise en jeu des métallothionéines ou des sidérophores semble plus compatible avec nos résultats que la sécrétion d'acides organiques.

On remarque qu'*A. cylindrospora*, espèce qui a l'influence la plus visible sur la spéciation minéralogique de Cd, est aussi celle qui le tolérait le mieux (jusqu'à 1000 $mg.L^{-1}$) en milieu gélosé et qui était une des plus performantes pour le biosorber en milieu liquide (40% en 3 jours, chapitre 3, paragraphe II.2.4, page 132). *Chaetomium atrobrunneum*, a montré des performances proches de celles *d'A. cylindrospora* en milieu liquide (chapitre 3, paragraphe II.4, page 132) et montre ici aussi une

influence similaire. On note en revanche que les carbonates diminuent pour le microcosme bioaugmenté avec *C. atrobrunneum* (sans pour autant qu'il y ait une influence sur la fraction carbonatée de Cd) mais pas avec *A. cylindrospora*. Cependant, la baisse de la proportion mobile de Cd reste faible et les quantités mobiles restent stables (2,3 $mg.kg^{-1}$ pour le microcosme témoin et 2,1 $mg.kg^{-1}$ pour la bioaugmentation avec *A. cylindrospora*). Cette tendance reste donc à confirmer, notamment en réalisant des expériences plus longues, avec un apport de biomasse plus important afin de favoriser les interactions entre le mycélium et les éléments métalliques.

Cas du Cuivre

La figure 35 montre les répartitions du Cu (en % par rapport au Cu total) dans les différentes fractions labiles des microcosmes. Les moyennes des valeurs (et les écarts-types) sont données dans le tableau 41 de l'annexe IX (page 259). Le pourcentage potentiellement mobile de Cu est de 37% pour le microcosme témoin. Les influences sont peu marquées pour la biostimulation (38%), et la bioaugmentation avec *C. atrobrunneum* (40%) et *C. micaceus* (40%). L'influence la plus marquée est celle de la bioaugmentation avec *A. cylindrospora*, qui diminue ce pourcentage labile de 37 à 30%. Ces variations ne sont pas statistiquement significatives ($p > 0,05$).

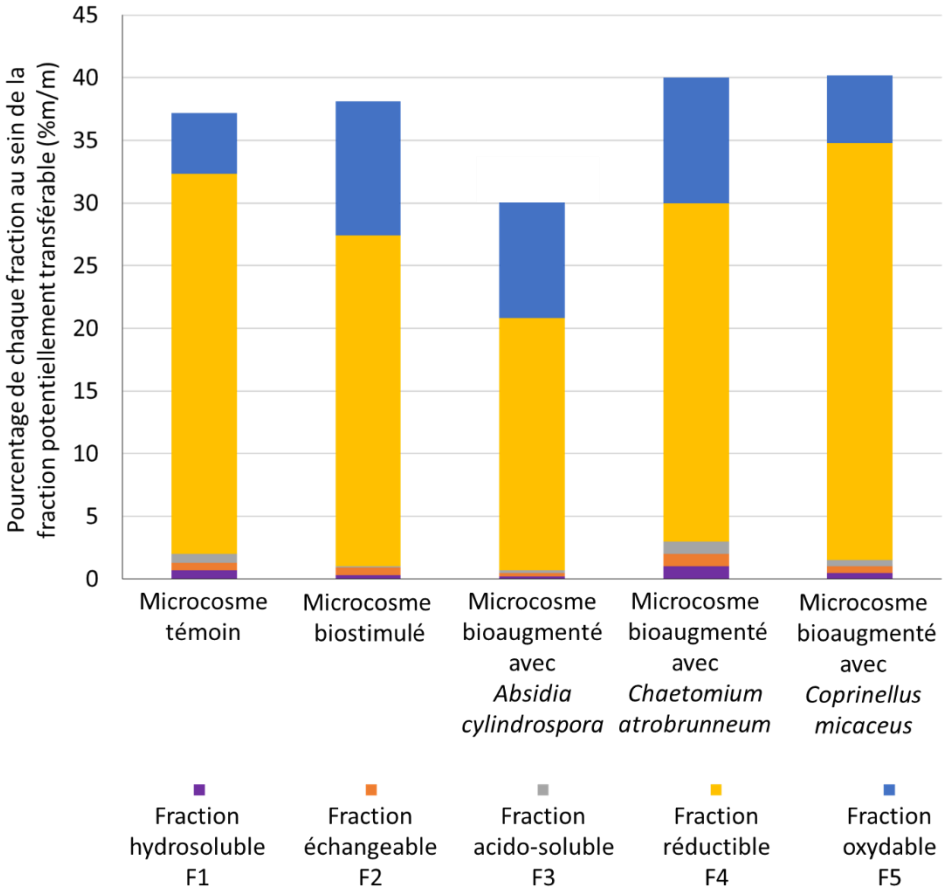


Figure 35 : répartition de Cu au sein des différentes fractions labiles des sols des microcosmes.

Aucun des traitements ne semble avoir une influence marquée sur le Cu lié à la fraction carbonatée qui reste très faible (<1%). La biostimulation diminue la fraction réductible de 4% par rapport au témoin. Cette diminution atteint 10% lors de la bioaugmentation avec *Absidia cylindrospora*. La bioaugmentation avec *Chaetomium atrobrunneum* a une influence plus faible sur cette fraction, mais du même ordre que la biostimulation (3%) alors que la bioaugmentation avec *Coprinellus micaceus* semble l'augmenter (+3%). Tous les procédés semblent en revanche augmenter le pourcentage de Cu lié à la fraction oxydable. La biostimulation et la bioaugmentation avec *A. cylindrospora* ont les plus fortes influence (respectivement +3 et +5%). Ces résultats suggèrent un probable transfert depuis la fraction réductible vers la fraction oxydable, ainsi que vers la fraction résiduelle pour *A. cylindrospora*. On peut donc supposer que des composés fongiques soient capables de mobiliser Cu depuis la fraction réductible pour les biosorber (augmentation de la fraction oxydable) et/ou permettre leur stabilisation et transfert vers la fraction résiduelle (ou leur évaporation). Il est probable que des métallothionéines puissent

remplir ce rôle et pourrait alors impliquer des modifications du potentiel d'oxydoréduction (Alloway 2013).

Chaetomium atrobrunneum biosorbait 42% du Cu en milieu liquide (chapitre 3, paragraphe II.2.4, page 132). Les résultats présentés ici suggèrent que cet isolat est capable de biosorber Cu (augmentation de la fraction oxydable), mais son influence est plus faible que celle d'*A. cylindrospora* qui ne biosorbait pourtant que 6% de Cu en milieu liquide. La plus faible production de biomasse de *C. atrobrunneum* influence certainement ce résultat. De plus, *C. atrobrunneum* n'a pas été retrouvé en surface du microcosme (chapitre 3, paragraphe II.3.2, page 159). Si on suppose qu'il n'a pas réussi à coloniser majoritairement le microcosme, il est alors logique de ne pas retrouver une influence en cohérence avec le screening. Il apparaît donc intéressant d'améliorer la production de biomasse de cette espèce afin de favoriser son développement au sein de la matrice pour éventuellement améliorer son influence sur Cu.

Cas du Plomb

La figure 36 montre les répartitions du Pb dans les différentes fractions des microcosmes (en % par rapport au Pb total). Les moyennes des valeurs (et les écarts-types) sont données dans le tableau 42 de l'annexe IX (page 260). Ici encore, les fractions F1 et F2 sont négligeables. Le pourcentage de Pb labile passe de 5% pour le microcosme témoin à 10% et 11% pour les microcosmes bioaugmentés avec *A. cylindrospora* et *C. atrobrunneum.* La biostimulation (5%) et la bioaugmentation avec *C. micaceus* (7%) semblent avoir peu d'influence sur le pourcentage de Pb potentiellement labile dans nos conditions expérimentales. Ces variations ne sont pas statistiquement significatives ($p > 0,05$ pour chaque condition). Au total, la bioaugmentation, quelle que soit la souche utilisée, semble ici plutôt augmenter la fraction potentiellement mobile de Pb (définie opérationnellement par l'extraction séquentielle appliquée), ce qui pourrait donc *a priori* engendrer sa diffusion dans l'environnement.

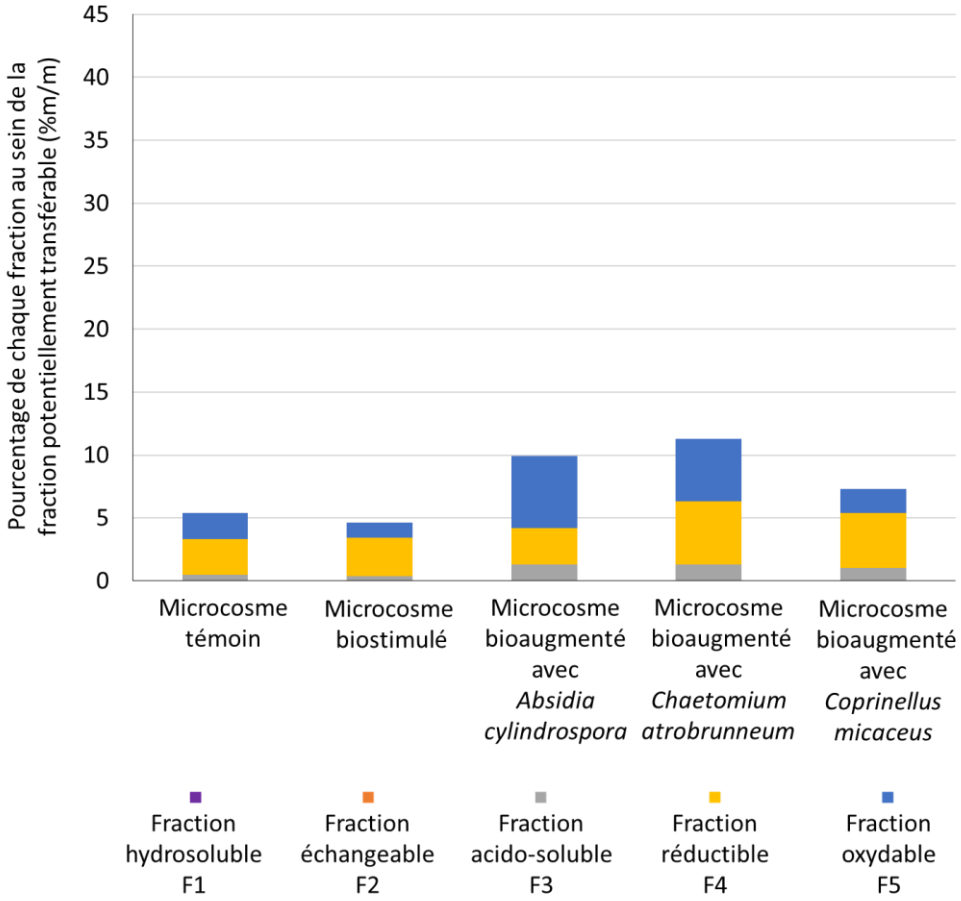


Figure 36 : répartition de Pb au sein des différentes fractions labiles des sols des microcosmes.

La fraction réductible est cette fois peu influencée par l'un ou l'autre des traitements (au maximum +2% suite à la bioaugmentation par *C. atrobrunneum*). La fraction carbonatée augmente faiblement suite à la bioaugmentation par *A. cylindrospora* (+1%) et *C. atrobrunneum* (+1%). Le Pb lié à la matière organique diminue après biostimulation et bioaugmentation par *C. micaceus.* En revanche, il augmente suite à la bioaugmentation avec *A. cylindrospora* (+4%) et *C. atrobrunneum* (+3%). Ces deux isolats semblent influencer de manière proche la répartition de Pb au sein des fractions minéralogiques.

Tout se passe comme si une remobilisation de Pb depuis la fraction résiduelle s'opérait, ce qui semble peu probable. Cette éventuelle capacité des champignons à capter les éléments métalliques au sein de la fraction résiduelle n'est pas clairement décrite dans la littérature. Seule une action en surface des argiles est décrite (Fomina et Gadd 2008). De plus, la fraction résiduelle est par définition la fraction non biodisponible. Ceci suggère donc que l'estimation de la fraction résiduelle (et donc des fractions disponibles) par la méthode employée n'est pas adaptée pour Pb. Ainsi, Baraud et al. (2012), en

comparant plusieurs méthodes, ont montré que l'extraction séquentielle utilisée ici n'estimait pas de manière convenable la fraction de Pb potentiellement biodisponible pour des radis.

En outre, la fraction oxydable, en plus de la matière organique, inclut également des sulfures (Baraud et al. 2012). Le transfert de Pb vers la fraction oxydable peut donc aussi s'interpréter comme la formation de sulfures de Pb, considérés comme stables et peu disponibles environnementalement. La formation de sulfure de Pb par des champignons à partir d'autres minéraux plombés a ainsi été décrite par plusieurs auteurs (Ehrlich 1998 ; Henderson et al. 2017). Des essais complémentaires sont nécessaires pour mieux caractériser ces transferts (autres méthodes d'extraction, estimation de la biodisponibilité réelle).

Comme pour *C. atrobrunneum*, le mycélium de *Coprinellus micaceus* n'a pas été retrouvé en surface des microcosmes (chapitre 3, paragraphe II.3.2, page 160) et on peut donc faire la même hypothèse : il est possible que cet isolat n'ait pas réussi à coloniser le microcosme. Son influence marquée sur Pb (biosorption de 100% en milieu liquide) n'est donc pas retrouvée ici (fraction potentiellement mobile non modifiée). Cependant, l'influence de *C. atrobrunneum* est visible sur la fraction oxydable qui double suite à son développement (comme avec *A. cylindrospora*). Même si le mycélium de cette espèce n'est pas retrouvé en surface du microcosme, il semble que son influence soit différente de celle de la biostimulation. L'influence de la bioaugmentation sur le développement de la flore fongique endogène (mycéliums de surfaces différents de ceux retrouvés en biostimulation) semble donc aussi avoir un effet sur les spéciations minéralogiques des métaux.

Cas des autres métaux (Ca, Cr, Mg, Fe, Ni, Zn)

La répartition d'autres éléments majeurs ou traces a également été déterminée. Les valeurs moyennes concernant les autres métaux sont données dans les tableaux 30 (en $mg.kg^{-1}$) et 31 (en pourcentages). Les valeurs expérimentales les concernant sont données dans l'annexe IX (tableaux 43 à 49, page 261 à 267). Les répartitions minéralogiques de ces éléments sont représentées dans la figure 67 (annexe IX, page 268).

Les traitements de biostimulation et de bioaugmentation ont tendance à augmenter la fraction potentiellement mobile de Ca, Cr, Fe, Mn. Nos résultats sous entendent une agressivité plus fortes des champignons que la méthode d'extraction utilisée. Cependant, le milieu GS apporté au microcosme contient entre autre Ca, Zn. L'apport est théoriquement négligeable (moins de 0,01% pour chaque métal, annexe VIII, page 255) mais n'a pas été vérifié expérimentalement. Un apport de métal dans la fraction mobile est donc aussi envisageable (l'apport potentiel par la sciure, supposé négligeable, n'a pas été vérifié).

La fraction potentiellement mobile de Zn est fortement diminuée par tous les traitements. Elle passe ainsi de 76% pour le microcosme témoin à 44% après bioaugmentation avec *A. cylindrospora* (figure 67 et tableau 49, annexe IX, page 267 et 268). Tous les traitements (biostimulation et bioaugmentation avec tous les isolats) induisent aussi une diminution des fractions acido-soluble et réductibles de Zn. L'hypothèse des acides organiques et des métallothionéines est donc plausible pour ce métal. On penche donc ici vers un changement de spéciation chimique et minéralogique qui tend à stabiliser Zn. Il faudrait cependant vérifier les teneurs totales en fin d'essai pour conclure quant à une éventuelle évaporation.

La non-spécificité des métabolites sécrétés ainsi que les interférences entre métaux complexifient l'interprétation des résultats quant aux hypothèses qui pourraient décrire les phénomènes observés. Des études plus précises sont nécessaires pour explorer les mécanismes en jeu (autres méthodes d'extraction plus adaptées, recherche des métabolites, évaluation des spéciations chimiques des éléments).

II.3.3. Discussion

Les différents résultats exposés illustrent la diversité et la complexité des interactions entre les champignons et les métaux au sein des matrices complexes que sont les sols. Ils suggèrent que la bioaugmentation a une influence variable sur la mobilité des métaux en fonction des isolats sélectionnés et des éléments considérés. La biostimulation a généralement moins d'influence que la bioaugmentation.

On remarque que le pH des microcosmes au départ et à la fin des expériences est peu modifié. Les acides organiques, comme l'acide oxalique, connus pour être impliqués dans ce genre de processus (Fomina et al. 2005; Gadd et al. 2014), sont probablement tamponnés par le pouvoir tampon du sol. De plus, les sécrétions acides sont très localisées et donc probablement insuffisantes pour influencer ce paramètre au bout de 20 jours d'incubation seulement (Smits 2009).

Nos résultats suggèrent aussi que la capacité de colonisation du sol par l'isolat fongique est importante afin de lui permettre d'interagir avec les métaux. De bons résultats en milieu simple ne sont donc pas forcément prédictifs de bons résultats en milieu plus complexe, d'autres paramètres entrant alors en jeu (accès au nutriments, autre toxique, compétition pour les sites de réaction (Fomina et al. 2003; Albarracín et al. 2010)). La bonne capacité d'*Absidia cylindrospora* à coloniser le microcosme entraîne une influence plus importante que celle des autres isolats pour Cd et Cu alors que les études en milieu plus simple ne la prédisposaient pas à ce résultat vis-à-vis de Cu.

D'après Robin et al. (2008), les sidérophores peuvent solubiliser les oxydes métalliques. La synthèse des sidérophores est induite par un déficit en Fe, ou un Fe difficilement biodisponible pour les champignons. La diminution des fractions réductibles est en accord avec cette hypothèse (notamment pour Cd, Cu et Zn). La sécrétion de métallothionéines conduirait aux mêmes évolutions. Elles sont donc probablement en jeu, ce qui correspondrait à l'évolution marquée de Zn.

D'après Stucki et al. (2007), une biostimulation par du glucose est en mesure de diminuer la proportion de fer potentiellement mobile. Cette biostimulation favorise la réduction du Fe en augmentant le ratio FeII/FeIII. Cette biostimulation semble donc faire intervenir le potentiel d'oxydo-réduction. Ces considérations sont en accord avec le rôle connu des sidérophores produit part les plantes et les micro-organismes, dont les champignons, pour l'acquisition du Fe (Renshaw et al. 2002; Robin et al. 2008; Szebesczyk et al. 2016 ; Crichton 2018). Selon nos résultats, la biostimulation ne semble pas avoir d'influence sur la répartition minéralogique de Fe (figure 67, page 268), cependant, nous n'ajoutons pas de sucres facilement assimilables. En revanche, nos résultats montrent un transfert de Fe vers la fraction réductible principalement, l'augmentant ainsi de +13% et +17% pour les microcosmes bioaugmentés avec *C. atrobrunneum* et *C. micaceus* (*A. cylindrospora* ne montre pas d'influence pour ce métal). Une

faible augmentation de la fraction oxydable est aussi notée (respectivement +1 et +2%). Même si ces deux champignons n'ont pas été retrouvés en surface des microcosmes, l'influence qu'ils induisent est différente de celle observée par la biostimulation. On peut alors supposer que la bioaugmentation avec ces 2 champignons induit la sécrétion de métabolites capables de capter Fe pour le transférer vers la fraction réductible (et oxydable) (Renshaw et al. 2002 ; Dighton 2003 ; Gadd 2008; Robin et al. 2008). Selon ces mêmes auteurs, les sidérophores sont peu sélectifs et spécifiques du Fe. Cu, ainsi que Zn et Ni, peuvent entrer en compétition pour les sites de fixation. Cependant, dans nos conditions, les fractions réductibles de Zn et Cu ont plutôt tendance à diminuer ou à rester stables.

Peu d'études comparables sont disponibles dans la littérature scientifique. Zhang et al. (2018) ont étudié l'influence d'un inoculat de *Phanerochaete chrysosporium* sur la dynamique des métaux (extrait par le protocole BCR) et de la matière organique au cours d'un processus de compostage. Leur échantillon est bien plus riche en matière organique (75%) que celui de notre étude (1%). D'après leurs résultats, l'influence de l'inoculation avec *P. chrysosporium* était la plus forte sur la fraction réductible pour Zn et Pb, diminuant la fraction totale potentiellement mobile de 20 et 7% pour ces métaux. Pour Cu, les fractions échangeables, réductibles et oxydables diminuaient, conduisant à une baisse globale de la fraction potentiellement mobile de 14%. Enfin, pour Ni, c'est principalement la fraction réductible qui était influencée, conduisant à une baisse de la fraction totale potentiellement mobile de 20%.

Nos résultats montrent des similitudes, notamment la baisse de la fraction potentiellement mobile de Zn (-32%) et Cu (-7%) dues à des modifications sur les fractions échangeables, réductibles (pour Zn) et sur les fractions réductibles et oxydables (Zn et Cu). En revanche, nos résultats montrent peu d'influence sur la spéciation minéralogique de Ni, ce qui contraste avec l'étude de Zhang et al. (2018). L'augmentation observée de la fraction mobile de Pb contraste elle aussi avec les résultats de cette étude et renforce les précautions concernant l'interprétation des résultats à propos de ce métal. Cette différence peut être due à la richesse en matières organiques de l'échantillon utilisé par Zhang et al. (2018) qui peut facilement fixer Pb. Or certaines matières organiques fraîches (cellulose et lignine notamment) sont aussi dégradées par les champignons, particulièrement lors des processus de compostage, en matière organique colloïdale (acides humiques). Ce procédé a donc pu favoriser la

biosorption de Pb par *P. chrysosporium*. Cette hypothèse est en accord avec la baisse du taux de COT et l'augmentation du taux d'acides humiques observées par Zhang et al. (2018) qui peuvent être interprétés comme une conséquence du processus de compostage par les champignons. Il est donc probable que la richesse en matières humiques (200 $g.kg^{-1}$) puisse favoriser l'influence des champignons sur les spéciations minéralogiques de métaux en favorisant leur biosorption.

Dans de nombreux cas, les études de bioremédiation utilisent des sols non contaminés enrichis en polluants métalliques. Cette différence de protocole est importante et surestime les potentiels de bioremédiation. En effet, dans l'étude de Peng et al. (2018), le Cd ajouté se répartissait majoritairement dans les fractions échangeable (de 20 à 40% selon les doses de Cd joutées) et carbonatées (environ 40% quelle que soit la dose de Cd ajoutée). Le fraction réductible (environ 40%) avait uniquement tendance à augmenter avec les plus important apport de Cd (passant à environ 50% à partir de 400 $mg.kg^{-1}$). Ces résultats indiquent que la fraction échangeable est la principale fraction dans laquelle se répartit le Cd ajouté (sous forme de $Cd(NO_3)_2$). De plus, un apport massif de nitrates et d'ions métalliques a probablement des conséquences non négligeables sur la flore endogène, le développement de la flore ajoutée, ainsi que sur les paramètres physico-chimiques de la matrice étudiée (pH, carbonates, COT notamment). La fraction résiduelle restait négligeable (de 0 à 0,16% quelle que soit l'apport en Cd) ce qui contraste fortement avec nos résultats. Le fait d'enrichir la matrice en Cd(II) fait que tout le Cd présent dans la matrice est facilement biodisponible et sera donc biosorbé par les champignons plus facilement que dans un sol réellement contaminé et non enrichi (à la condition que l'isolat le tolère suffisamment et/ou que les nutriments soient suffisamment disponibles pour permettre son développement). Les réarrangements au sein des fractions minéralogiques n'ont pas le temps de se mettre en place (les paramètres de pH, COT et carbonates ne sont pas évoqués dans l'étude). Il est donc important d'utiliser de vrais sols contaminés dans de telles études afin d'avoir une représentativité plausible des spéciations minéralogiques et du potentiel des epèces.

L'étude de Qian et al. (2009) a montré que des amendements d'apatite et ferrihydrite diminuait la fraction potentiellement mobile de 20% pour Pb, 10% pour Zn, 10% pour Cu et 10% pour Cd après 5 mois de traitement (les échantillons ayant un pH de 7 et un COT de 3%), principalement en induisant

un transfert depuis les fractions réductibles et oxydables vers la fraction résiduelle pour Cd et Zn et depuis les fractions acido-solubles et réductibles vers la fraction résiduelle pour Pb. En comparaison, au cours de nos travaux, les fractions potentiellement mobiles de Cu et Cd ont diminué de près de 5% et celle de Zn de 32% après 20 jours seulement (bioaugmentation avec *A. cylindrospora*). Pour ces 3 métaux, les transferts impliquaient principalement une diminution de la fraction réductible. Pour Zn, une diminution de la fraction acido-soluble était aussi présente. Les transferts semblent donc différents. De plus, la fraction oxydable augmentait dans notre cas pour Cd et Cu.

Nos résultats, même s'ils doivent être approfondis confirment bien le potentiel des organismes fongiques dans les procédés de traitement biologique de sols contaminés par des métaux. Il semble donc opportun de chercher à optimiser cette "mycoremédiation", même si les processus en jeu sont multiparamétriques et complexes.

II.3.4. Essai de germination

Afin d'évaluer un éventuel lien entre la diminution de la fraction potentiellement mobile des métaux et une baisse de toxicité, des essais de germination ont été réalisés à partir des microcosmes biostimulés et bioaugmentés avec *Absidia cylindrospora*. Ils ont été réalisés comme le décrit le paragraphe II.3.2.6 du chapitre 2 (page 90).

Les tests statistiques réalisés ne permettent pas de conclure à une diminution de la toxicité du sol contaminé traité par biostimulation ou par bioaugmentation avec *A. cylindrospora*, notamment à cause d'une trop grande variabilité des résultats. Cependant, comme le montre la figure 37, ces derniers montrent une tendance à un meilleur développement des plantules dans les microcosmes biostimulés et bioaugmentés. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour approfondir et conclure quant à ces résultats. La présence d'autres composés toxiques perturbe probablement cette expérience.

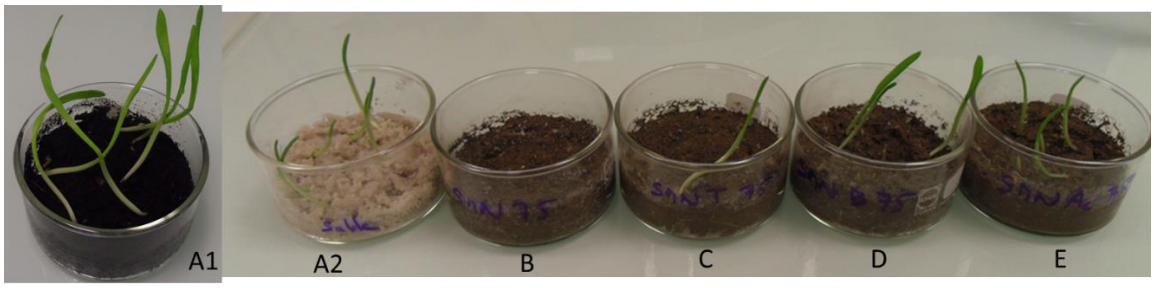


Figure 37 : photographies des essais de germination après 4 jours d'incubation. A1 : témoin terreau, A2 : témoin sable, B : sol pollué, C : microcosme témoin, D : microcosme biostimulé, E : microcosme bioaugmenté avec A. cylindrospora.

II.3.5. Conclusion

Les essais en microcosme de sol nous ont permis de mettre en évidence l'influence du développement fongique, soit de la flore endogène (biostimulation) ou d'une espèce allochtone (bioaugmentation), sur la répartition des métaux au sein de différentes fractions minéralogiques de sol. La bioaugmentation avec *Absidia cylindrospora* a montré une influence souvent plus importante que les autres conditions et le mycélium de cette espèce a colonisé de manière importante le microcosme. Les deux autres isolats ajoutés lors de la bioaugmentation n'ont pas été retrouvés en surface des microcosmes, ce qui est un indice en faveur d'une faible colonisation. Malgré cela, les influences de ces deux bioaugmentations sur les répartitions minéralogiques des métaux ne sont pas équivalentes à la biostimulation et ne sont pas équivalentes entre elles (pour Cu notamment).

Il apparaît que la bioaugmentation et la biostimulation permettent de diminuer la fraction potentiellement mobile de Cd et Cu, avec un effet plus marqué pour la bioaugmentation, notamment avec *A. cylindrospora*. En ce qui concerne Pb, la bioaugmentation avec *A. cylindrospora* et *C. atrobrunneum* semble augmenter cette fraction totale potentiellement mobile, alors que les autres traitements n'ont pas d'influence. Ces traitements ont également une incidence sur la répartition d'autres éléments tels que Ca, Cr, Fe, Mn et Zn. Cependant, nos résultats suggèrent aussi que la méthode employée peut ne pas estimer de manière convenable la fraction résiduelle de Pb (entre autres). Ces interprétations sont donc à confirmer par d'autres méthodes.

Peu de nos résultats sont statistiquement significatifs. Il semble donc opportun de réaliser des expériences complémentaires afin d'amplifier les résultats obtenus. Un apport plus massif de biomasse fongique et un temps de développement plus long des microcosmes permettraient peut-être de montrer des influences plus marquées que celles observées ici. Nos résultats confirment cependant le potentiel de ces isolats, utilisés en bioaugmentation, pour diminuer la fraction potentiellement mobile de deux éléments toxiques que sont Cd et Cu. L'augmentation de cette fraction pour Pb pourrait permettre la dispersion environnementale de cet élément. Cette augmentation de la mobilité pourrait aussi être mise à profit dans des traitements de phytoextraction couplés aux champignons. Deng et al. (2011) ont montré qu'un isolat (*Mucor sp*) résistant au Cd et au Pb était capable d'améliorer leur biodisponibilité envers les plantes. Cependant, cette augmentation de mobilité signifie potentiellement également une possible diffusion de la pollution au sein des écosystèmes et/ou une augmentation de la toxicité. La maîtrise des transferts de métaux, afin d'éviter leur diffusion, apparaît comme une difficulté importante des procédés faisant intervenir plusieurs espèces (ici plantes et champignons).

Les paramètres du sol (notamment pH et carbonates) sont importants pour la mobilité et les transferts de métaux. Il nous semble donc opportun de réaliser des expériences avec d'autres types de sol afin de confronter les résultats. Un suivi du potentiel redox permettrait de compléter la caractérisation des microcosmes. Des essais complémentaires sont aussi nécessaires pour affiner l'essai de germination.

Conclusion générale et Perspectives

Conclusion générale et perspectives

Les objectifs de ce travail de thèse étaient d'identifier et de tester des isolats fongiques d'origine tellurique, principalement issus de sols contaminés, vis-à-vis de la biosorption de trois éléments : Cd, Cu et Pb, qui sont des polluants majeurs de l'environnement et d'évaluer l'intérêt de ces isolats pour le développement de méthodes de biodépollution des sols basées sur la biosorption et la biostabilisation des contaminants métalliques. Ce travail s'est organisé en 3 étapes. Une première étape a consisté en la mise au point d'une méthode d'évaluation des capacités de biosorption en milieu liquide et de tolérance en milieu gélosé avec une espèce modèle du laboratoire. La seconde étape a consisté en l'application de la méthode à 28 isolats fongiques. Ce screening a permis de sélectionner 3 isolats à haut potentiel de biosorption pour la troisième étape qui a consisté en la mise au point d'un essai en microcosme de sol contaminé.

Les études en milieu liquide et en milieu gélosé confirment le potentiel des champignons pour la tolérance et la biosorption des métaux. Certains isolats montrent des profils intéressants et nos résultats suggèrent qu'il est pertinent d'explorer la biodiversité fongique dans ce but. En effet, certains isolats sont capables de tolérer de hautes doses de métal en milieu gélosé (jusqu'à 1000 $mg.L^{-1}$ de Cd pour *Absidia cylindrospora*, 1000 $mg.L^{-1}$ de Cu pour *Fusarium oxysporum* et 1000 $mg.L^{-1}$ de Pb pour 9 isolats de l'étude). Ces isolats sont de plus capables de biosorber significativement ces métaux en milieu liquide : plus de 50% de Cd sont ainsi biosorbés par *Absidia cylindrospora,* plus de 40% de chacun des 3 métaux sont biosorbés par *Chaetomium atrobrunneum* et *Perenniporia fraxinea* et enfin, *Coprinellus micaceus* biosorbe 100% du Pb présent dans le milieu de culture. Nos résultats suggèrent que la production de biomasse est un paramètre clé dans la tolérance et la biosorption des métaux. Accroître cette production semble donc être une piste intéressante pour améliorer les capacités de biosorption des isolats à croissance plus lente comme les Agarics qui présentent de très bon résultats de tolérance.

Des études complémentaires pourraient permettre d'affiner nos résultats. Par exemple, une étude cinétique de biosorption donnerait des informations concernant les équilibres en jeu. Ces équilibres

obéissent souvent aux modèles de Langmuir et/ou de Freundlich (Velmurugan et al. 2010; Desaunay 2011; Fomina and Gadd 2014). Des essais impliquant plusieurs métaux renseigneraient sur les compétitions éventuelles entre éléments pour les sites de sorption sur les structures fongiques. Des essais avec des pollutions mixtes comprenant des métaux et des HAP seraient aussi envisageables. Enfin, des essais couplant plusieurs isolats fongiques permettraient de mettre au point des consortiums dans le but de potentialiser les capacités de biosorption et de biodégradation des différentes espèces (Kothe and Büchel 2014; Mishra and Malik 2014; García-Delgado et al. 2015; Gola et al. 2016; Dey et al. 2016). D'un point de vue plus mécanistique, il serait intéressant d'étudier les profils de sécrétion des divers isolats soumis aux stress métalliques (et organiques) en milieu simple afin de préciser les mécanismes en jeu. Il serait par exemple assez pertinent de doser l'acide oxalique et d'autres métabolites comme les métallothionéines ou les sidérophores afin de voir si ces composés sont sécrétés, si la nature des éléments métalliques influence cette sécrétion, afin de la corréler à des contaminants pour ensuite les rechercher dans les études en microcosme et éventuellement chercher à favoriser leur synthèse s'ils s'avèrent intéressants pour les objectifs de remédiation (Arwidsson et al. 2010 ; Renshaw 2002). Nos résultats en milieu liquide semblent indiquer la pertinence d'envisager des essais de biodépollution de matrices liquides.

L'étude en microcosme de sols utilisant ces isolats sélectionnés révèle l'influence du développement fongique sur la flore autochtone, sur certains paramètres du sol et sur la répartition minéralogique des métaux. Ainsi, *Absidia cylindrospora* semble capable de diminuer la fraction potentiellement mobile de Cd et Cu. En revanche, l'évolution de la fraction mobile de Pb est plus complexe à interpréter. Ces résultats encourageants doivent cependant être confirmés par des études plus approfondies (incubation des expériences plus longues, apport de biomasse plus important, tests avec différents types de sols et d'autres espèces fongiques, étude cinétique) afin d'acquérir des données complémentaires. Il apparaît aussi intéressant de chercher des méthodes d'amélioration de production de la biomasse, ce paramètre étant souvent primordial et limitant en ce qui concerne la biosorption des métaux. Une simple augmentation de la température de croissance pour les espèces thermotolérantes comme *Chaetomium atrobrunneum* pourrait éventuellement améliorer ce paramètre (en laboratoire). Il

semble aussi opportun de confronter nos résultats à des extractions de métaux par une autre méthode (EDTA par exemple) et à un dosage des métaux dans les milieux nutritifs apportés aux microcosmes afin de mieux appréhender les évolutions observées. Doser les métaux dans les racines et/ou les tiges des plantes se développant sur des sols traités afin de corréler la fraction biodisponible mesurée à la modification de la répartition minéralogique des métaux dans les sols semble aussi important.

Il apparaît important de caractériser au mieux ces interactions afin de maîtriser ces processus complexes. Certains auteurs (Gao et al. 2010; Audet 2014; Sun et al. 2017) ont montré que la phytoextraction de Pb pouvait être amélioré par une inoculation concomitante des racines avec des champignons mycorhiziens et non mycorhiziens (du genre *Mucor* par exemple, un genre proche d'*Absidia cylindrospora*). Nos résultats semblent compatibles avec ces études. On pourrait donc envisager la mise au point de méthodes de remédiation incluant plantes et champignons. Les champignons seraient ainsi capables de stabiliser Cd et Cu, souvent rapidement phytotoxiques et gênant le développement des plantes, et améliorer la phytostabilisation, ou la phytoextraction de Pb. Ils pourraient de plus favoriser la recolonisation de sols pollués par les plantes en favorisant la prise des oligo-éléments. Cependant, la grande variabilité des types de sols, des formes chimiques des métaux, des espèces fongiques (et des plantes) présentes, crée des systèmes complexes qui nécessitent de nombreux approfondissements avant d'être envisagés pour un usage sur le terrain. En effet, favoriser les transferts signifie aussi potentiellement favoriser la dispersion des toxiques, notamment vers les eaux de ruissellement, les nappes phréatiques et l'ensemble de la biosphère. Un couplage avec des méthodes physicochimiques ou biochimiques pourrait aussi être envisagé.

Références Bibliographiques

Adamo P, Iavazzo P, Albanese S, Agrelli D, De Vivo B, Lima A (2014) Bioavailability and soil-to-plant transfer factors as indicators of potentially toxic element contamination in agricultural soils. Sci Total Environ 500–501:11–22.

ADEME, INERIS (2017) Les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués (nouveaux résultats de recherche et démonstration). 68 p.

ADEME (2015) Sols et Environnement Chiffres clés Edition 2015. 108 p.

ADEME (2014) Taux d'utilisation et coût des différentes techniques et filières de traitement des sols et des eaux souterraines pollués en France : données 2012. 148 p.

ADEME (2012) Taux d'utilisation et coûts des différentes techniques et filières de traitement des sols et des eaux souterraines pollués en France, Synthèse des données 2010. 114p

ADEME et SOGREAH (2007) Bilan des flux de contaminants entrant sur les sols agricoles de France métropolitaine. 330 p.

Ahmad P, Rasool S (eds) (2014) Emerging technologies and management of crop stress tolerance. Volume 2: A sustainable approach. Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, Amsterdam Boston. 514 p.

Albarracín V, Amoroso M, Abate CM (2010) Bioaugmentation of copper polluted soil microcosms with *Amycolatopsis tucumanensis* to diminish phytoavailable copper for *Zea mays* plants. Chemosphere 79:131–137.

Albert Q, Leleyter L, Lemoine M, Heutte N, Rioult J-P, Sage L, Baraud F, Garon D (2018) Comparison of tolerance and biosorption of three trace metals (Cd, Cu, Pb) by the soil fungus *Absidia cylindrospora.* Chemosphere 196:386–392.

Alegria Terrazas R, Giles C, Paterson E, Robertson-Albertyn S, Cesco S, Mimmo T, Pii Y, Bulgarelli D (2016) Chapter One - Plant–Microbiota Interactions as a Driver of the Mineral Turnover in the Rhizosphere. In: Gadd GM (ed) Advances in Applied Microbiology. Academic Press, 1–67.

Ali A, Guo D, Mahar A, Wang P, Shen F, Li R, Zhang Z (2017) Mycoremediation of Potentially Toxic Trace Elements—a Biological Tool for Soil Cleanup: A Review. Pedosphere 27:205–222.

Amiard JC (2011) Les risques chimiques environnementaux: méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes. Éditions Tec & Doc : Lavoisier, Paris. 782 p.

ANSES (2017) Valeurs toxicologiques de référence - Guide d'élaboration de l'Anses. ANSES. 186 p.

Antoniadis V, Levizou E, Shaheen SM, Ok YS, Sebastian A, Baum C, Prasad MNV, Wenzel WW, Rinklebe J (2017) Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation–A review. Earth-Sci Rev 171:621–645.

Arwidsson Z, Johansson E, Kronhelm T von, Allard B, Hees P van (2010) Remediation of Metal Contaminated Soil by Organic Metabolites from Fungi I—Production of Organic Acids. Water Air Soil Pollut 205:215-226.

Audet P (2014) Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Metal Phytoremediation. In: Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance. Elsevier, 133–160.

Baize D, Barriuso E, Blanca Y, Boulonne L, Briand O, Cabidoche YM, Caria G, Chéry P, Cluzeau D, Cousin I, Couturier A, Decaëns T, Denoroy P, Dequiedt S, Derrière N, Desbourdes S, Dupuits E, Fardeau JC, Feix I, Gabrielle B, Gibaud C, Guernion M, Hartmann A, Hénault C, Jamagne M, Jolivet C, Laroche B, Le Martret H, Lehmann S, Lemercier B, Lucas S, Malet JP, Martin M, Massad RS, Miskovsky JC, Moulin J, Morard V, Nazaret S, Pasquier C, Péres G, Perrin JL, Perrin P, Ranjard L, Richard G, Richer de Forges A, Estrade JR, Saby N, Sauter J, Schnebelen N, Vibert MA, Walter C (2011) L'Etat des sols de France. GIS Sol, Paris. 192 p.

Baize D, Deslais W, Saby N (2007) Teneur en huit éléments en traces (Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn) dans les sols agricoles en France. Résultats d'une collecte de données à l'échelon national. Rapport final simplifié. ADEME. 86 p.

Baize D (2000) Guide des analyses en pédologie. 2ème édition revue et augmentée. INRA Éditions, Paris. 257 p.

Baldrian P (2002) Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. FEMS Microbiol Lett 206:69–74.

Baldrian P (2003) Interactions of heavy metals with white-rot fungi. Enzyme Microb Technol 32:78–91.

Baldrian P (2006) Fungal laccases – occurrence and properties. FEMS Microbiol Rev 30:215–242.

Baldrian P, in der Wiesche C, Gabriel J, Nerud F, Zadražil F (2000) Influence of Cadmium and Mercury on Activities of Ligninolytic Enzymes and Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in Soil. Appl Environ Microbiol 66:2471–2478.

Baldrian P, Valášková V, Merhautová V, Gabriel J (2005) Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. Res Microbiol 156:670–676.

Ballhausen M-B, de Boer W (2016) The sapro-rhizosphere: Carbon flow from saprotrophic fungi into fungus-feeding bacteria. Soil Biol Biochem 102:14-17.

Ballou ER, Wilson D (2016) The roles of zinc and copper sensing in fungal pathogenesis. Curr Opin Microbiol 32:128–134.

Baraud F, Leleyter L (2012) Prediction of phytoavailability of trace metals to plants: Comparison between chemical extractions and soil-grown radish. Comptes Rendus Geosci 344:385–395.

Baraud F, Leleyter L, Lemoine M, Hamdoun H (2017) Cr in dredged marine sediments: Anthropogenic enrichment, bioavailability and potential adverse effects. Mar Pollut Bull. 120:303–308.

Bellec P, Lavarde P, Lefebvre L, Madignier ML (2015) Proposition pour un cadre national de gestion durable des sols. Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie. Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt. 135 p.

Bernard L, Maron PA, Mougel C, Nowak V, Leveque J, Marol C, Balesdent J, Gibiat F, Ranjard L (2009) Contamination of Soil by Copper Affects the Dynamics, Diversity, and Activity of Soil Bacterial Communities Involved in Wheat Decomposition and Carbon Storage. Appl Environ Microbiol 75:7565–7569.

Bernheim Y (1999) Typologie des techniques de réhabilitation des sites pollués. In: Ref TIP800WEB - Environ. https://www-techniques-ingenieur-fr.ezproxy.normandie-univ.fr/base-documentaire/environnement-securite-th5/gestion-des-sites-et-sols-pollues-42440210/typologie-des-techniques-de-rehabilitation-des-sites-pollues-g2600/. Consult2 le 26.02.2018.

Bernhoft RA (2013) Cadmium toxicity and treatment. ScientificWorldJournal 2013:394-652.

Bert V (2013) Les phytotechnologies. EDP Sciences. 86 p.

Bes CM, Jaunatre R, Mench M (2013) Seed bank of Cu-contaminated topsoils at a wood preservation site: impacts of copper and compost on seed germination. Environ Monit Assess 185:2039–2053.

Bills G, Christensen M, Powell M, Thorn G (2004) 13 - Saprobic Soil Fungi. In: Biodiversity of Fungi. Academic Press, Burlington, 271–302.

Bisson M, Houeix N (2014) Cadmium et ses dérivés. INERIS. 111 p.

Bolan N, Kunhikrishnan A, Thangarajan R, Kumpiene J, Park J, Makino T, Kirkham MB, Scheckel K (2014) Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – To mobilize or to immobilize? J Hazard Mater 266:141–166.

Booth C (1971) The genus Fusarium. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 237 p.

Borowik A, Wyszkowska J, Oszust K (2017) Functional Diversity of Fungal Communities in Soil Contaminated with Diesel Oil. Front Microbiol 8:1862.

Botton B, Larpent J-P (eds) (1990) Moisissures utiles et nuisibles: importance industrielle, 2. éd. rev. et complétée. Masson, Paris. 209 p.

Bourceret A, Cébron A, Tisserant E, Poupin P, Bauda P, Beguiristain T, Leyval C (2016) The Bacterial and Fungal Diversity of an Aged PAH- and Heavy Metal-Contaminated Soil is Affected by Plant Cover and Edaphic Parameters. Microb Ecol 71:711–724.

Brevik EC, Steffan JJ, Burgess LC, Cerdà A (2017) Links Between Soil Security and the Influence of Soil on Human Health. In: Field DJ, Morgan CLS, McBratney AB (eds) Global Soil Security. Springer International Publishing, Cham, 261–274.

Burford EP, Kierans M, Gadd GM (2003) Geomycology: fungi in mineral substrata. Mycologist 17:98–107.

Carré F, Caudeville J, Bonnard R, Bert V, Boucard P, Ramel M (2017) Soil Contamination and Human Health: A Major Challenge for Global Soil Security. In: Field DJ, Morgan CLS, McBratney AB (eds) Global Soil Security. Springer International Publishing, Cham, 275–295.

Carrillo-González R, Šimůnek J, Sauvé S, Adriano D (2006) Mechanisms and Pathways of Trace Element Mobility in Soils. In: Advances in Agronomy. Academic Press, 111–178.

Ceci A, Rhee YJ, Kierans M, Hillier S, Pendlowski H, Gray N, Persiani AM, Gadd GM (2015) Transformation of vanadinite [Pb5 (VO4)3 Cl] by fungi. Environ Microbiol 17:2018–2034.

CETE Lyon (2007) Mobilité et biodisponibilité des contaminants présents dans les sols aux abords des infrastructures et impact sur la santé - rapport intermédiaire. 85 p.

Chamannejadian A, Sayyad G, Moezzi A, Jahangiri A (2013) Evaluation of estimated daily intake (EDI) of cadmium and lead for rice (*Oryza sativa* L.) in calcareous soils. Iran J Environ Health Sci Eng 10:28.

Chanda D, D. Sharma G, K. Jha D, Hijri M (2017) Tolerance of Microorganisms in Soil Contaminated with Trace Metals: An Overview. In: Recent advances in Applied Microbiology. 165–193.

Chatterjee S, Sarma MK, Deb U, Steinhauser G, Walther C, Gupta DK (2017) Mushrooms: from nutrition to mycoremediation. Environ Sci Pollut Res 24:19480–19493.

Chen M, Xu P, Zeng G, Yang C, Huang D, Zhang J (2015a) Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. Biotechnol Adv 33:745–755.

Chen SH, Ng SL, Cheow YL, Ting ASY (2017) A novel study based on adaptive metal tolerance behavior in fungi and SEM-EDX analysis. J Hazard Mater 334:132–141.

Chen A, Shang C, Zeng G, Chen G, Shao J, Zhang J, Huang H (2015b) Extracellular secretions of *Phanerochaete chrysosporium* on Cd toxicity. Int Biodeterior Biodegrad 105:73–79.

Chenu C, Rumpel C, Lehmann J (2015) Chapter 13 - Methods for Studying Soil Organic Matter: Nature, Dynamics, Spatial Accessibility, and Interactions with Minerals. In: Paul EA (ed) Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition). Academic Press, Boston, 383–419.

Chon H-T, Lee J-U, Lee J (2017) Chapter 15 - Heavy Metals Contamination of Mine Soil, Their Risk Assessment, and Bioremediation. In: Bech J, Bini C, Pashkevich MA (eds) Assessment, Restoration and Reclamation of Mining Influenced Soils. Academic Press, 387–417.

Clipson N, Gleeson DB (2012) Fungal Biogeochemistry: A Central Role in the Environmental Fate of Lead. Curr Biol 22:R82–R84.

Colombano S (2010) Quelles techniques pour quels traitements - Analyse coûts-bénéfices, Rapport final BRGM. 403 p.

Courtecuisse R, Duhem B (2013) Champignons de France et d'Europe. Delachaux et Niestlé, Paris. 475 p.

Cristaldi A, Conti GO, Jho EH, Zuccarello P, Grasso A, Copat C, Ferrante M (2017) Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals and PAHs. A brief review. Environ Technol Innov 8:309–326.

Danesh YR, Tajbakhsh M, Goltapeh EM, Varma A (2013) Mycoremediation of Heavy Metals. In: Goltapeh EM, Danesh YR, Varma A (eds) Fungi as Bioremediators. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 245–267.

Das N (2010) Recovery of precious metals through biosorption - A review. Hydrometallurgy 103:180-189.

Das S, Raj R, Mangwani N, Dash HR, Chakraborty J (2014) 2 - Heavy Metals and Hydrocarbons: Adverse Effects and Mechanism of Toxicity. In: Microbial Biodegradation and Bioremediation. Elsevier, Oxford, 23–54.

Davet P, Rouxel F (1997) Détection et isolement des champignons du sol. Institut national de la recherche agronomique, Paris. 208 p.

Deacon J (2010) Fungal biology, 4. ed., [Nachdr.]. Blackwell Publ, Malden, Mass. 371 p.

Dell'Anno A, Beolchini F, Gabellini M, Rocchetti L, Pusceddu A, Danovaro R (2009) Bioremediation of petroleum hydrocarbons in anoxic marine sediments: Consequences on the speciation of heavy metals. Mar Pollut Bull 58:1808–1814.

Deng Z, Cao L, Huang H, Jiang X, Wang W, Shi Y, Zhang R (2011) Characterization of Cd- and Pb-resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapes (*Brassica chinensis*) in a metal-contaminated soil. J Hazard Mater 185:717–724.

Desaunay A (2011) Etude et modélisation de la biosorption des métaux par les bactéries. Application au transfert du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange par *Escherichia coli* et *Cupriavidus metallidurans* en colonnes de sable d'Hostun. Grenoble. 248 p.

Dey P, Gola D, Mishra A, Malik A, Kumar P, Singh DK, Patel N, von Bergen M, Jehmlich N (2016) Comparative performance evaluation of multi-metal resistant fungal strains for simultaneous removal of multiple hazardous metals. J Hazard Mater 318:679–685.

Dhankhar R, Hooda A (2011) Fungal biosorption – an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. Environ Technol 32:467–491.

Dighton J (2003) Fungi in ecosystem processes. Dekker, New York. 432 p.

Dixit R, Wasiullah E, Malaviya D, Pandiyan K, Singh U, Sahu A, Shukla R, Singh B, Rai J, Sharma P, Lade H, Paul D (2015) Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. Sustainability 7:2189–2212.

Domsch KH (1980) Compendium of soil fungi. Academic Press, London, New York. 860 p.

Domsch KH, Gams W, Anderson T-H (1995) Compendium of Soil Fungi. Lubrecht & Cramer Ltd, Eching. 860 p.

Dumat C, Austruy A (2014) Phytotechnologies pour la gestion des sols pollués par les métaux. In: Ref TIP800WEB - Environ. https://www-techniques-ingenieur-fr.ezproxy.normandie-univ.fr/base-documentaire/environnement-securite-th5/gestion-des-sites-et-sols-pollues-42440210/phytotechnologies-pour-la-gestion-des-sols-pollues-par-les-metaux-g2635/. Consulté le 26.02.2018.

Elekwachi CO, Andresen J, Hodgman TC (2014) Global Use of Bioremediation Technologies for Decontamination of Ecosystems. Journal of Bioremediation & Biodegradation 5:1–9.

Eom IC, Rast C, Veber AM, Vasseur P (2007) Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. Ecotoxicol Environ Saf 67:190–205.

European Commission (2015) proposal for a Soil Framework Directive. http://ec.europa.eu/environment/soil/process_en.htm. Consulté le 19.11.2018.

European Commission, Joint Research Centre, Global Soil Biodiversity Initiative (2016) Global soil biodiversity atlas. 180 p.

European Environment Agency (2015) L'environnement en Europe: état et perspectives 2015 : synthèse. Office des publications de l'Union européenne, Luxembourg. 208 p.

Evdokimova GA, Korneykova MV (2010) Microfungal communities in soil polluted with fluoride. Nat Sci 02:1022–1029.

Favero N, Costa P, Massimino ML (1991) In vitro uptake of cadmium by basidiomycetes*Pleurotus ostreatus*. Biotechnol Lett 13:701–704.

Fomina M, Alexander IJ, Colpaert JV, Gadd GM (2005) Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. Soil Biol Biochem 37:851–866.

Fomina M, Gadd GM (2007) Metal and mineral transformations: a mycoremediation perspective. In: Robson GD, van West P, Gadd G (eds) Exploitation of Fungi. Cambridge University Press, Cambridge, 236–254.

Fomina M, Gadd GM (2014) Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. Bioresour Technol 160:3–14.

Fomina M, Ritz K, Gadd GM (2003) Nutritional influence on the ability of fungal mycelia to penetrate toxic metal-containing domains. Mycol Res 107:861–871.

Foti L, Dubs F, Gignoux J, Lata J-C, Lerch TZ, Mathieu J, Nold F, Nunan N, Raynaud X, Abbadie L, Barot S (2017) Trace element concentrations along a gradient of urban pressure in forest and lawn soils of the Paris region (France). Sci Total Environ 598:938–948.

Foucault Y, Durand MJ, Tack K, Schreck E, Geret F, Leveque T, Pradere P, Goix S, Dumat C (2013a) Use of ecotoxicity test and ecoscores to improve the management of polluted soils: case of a secondary lead smelter plant. J Hazard Mater 246–247:291–299.

Foucault Y, Lévêque T, Xiong T, Schreck E, Austruy A, Shahid M, Dumat C (2013b) Green manure plants for remediation of soils polluted by metals and metalloids: Ecotoxicity and human bioavailability assessment. Chemosphere 93:1430–1435.

Fourest E, Chambaz E (1993) Etude des mécanismes de biosorption des métaux lourds par des biomasses fongigues industrielles en vue d'un procédé d'éputation des effluents aqueux contaminés = Investigation of heavy metal biosorption by fungal by-products and its application to metal loaded waste water purification. http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=158533. Consulté le 14.10.2016.

Gabriel J, Baldrian P, Hladíková K, Háková M (2001) Copper sorption by native and modified pellets of wood-rotting basidiomycetes. Lett Appl Microbiol 32:194–198.

Gadd GM (1994) Interactions of Fungi with Toxic Metals. In: Powell, Renwick, Peberdy (eds) The Genus Aspergillus. Springer US, 361–374.

Gadd GM (2016) Fungi and Industrial Pollutants. In: Environmental and Microbial Relationships. Springer, Cham, 99–125.

Gadd GM (2017) Heavy Metal Pollutants: Environmental and Biotechnological Aspects. In: Reference Module in Life Sciences. Elsevier, 321-334.

Gadd GM (2008) Fungi and Their Role in the Biosphere - Fath, Sven Erik JørgensenBrian D. In: Encyclopedia of Ecology. Academic Press, Oxford, 1709–1717.

Gadd GM (2004) Mycotransformation of organic and inorganic substrates. Mycologist 18:60–70.

Gadd GM, Bahri-Esfahani J, Li Q, Rhee YJ, Wei Z, Fomina M, Liang X (2014) Oxalate production by fungi: significance in geomycology, biodeterioration and bioremediation. Fungal Biol Rev 28:36–55.

Gao Y, Miao C, Mao L, Zhou P, Jin Z, Shi W (2010) Improvement of phytoextraction and antioxidative defense in *Solanum nigrum* L. under cadmium stress by application of cadmium-resistant strain and citric acid. J Hazard Mater 181:771–777.

García MA, Alonso J, Melgar MJ (2009) Lead in edible mushrooms: Levels and bioaccumulation factors. J Hazard Mater 167:777–783.

García-Delgado C, Yunta F, Eymar E (2015) Bioremediation of multi-polluted soil by spent mushroom (*Agaricus bisporus*) substrate: Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation and Pb availability. J Hazard Mater 300:281–288.

Garon D, Guéguen J (2015) Biodiversité et évolution du monde fongique, 2015th edn. EDP Sciences. 208 p.

Garon D, Krivobok S, Seigle-Murandi F (2000) Fungal degradation of fluorene. Chemosphere 40:91–97.

Garon D, Sage L, Wouessidjewe D, Seigle-Murandi F (2004) Enhanced degradation of fluorene in soil slurry by *Absidia cylindrospora* and maltosyl-cyclodextrin. Chemosphere 56:159–166.

Genre A, Bonfante P (2012) 3 The Interface Between Plants and Mycorrhizal Fungi: Nutrient Exchange, Signaling and Cell Organization. In: Fungal Associations. Springer, Berlin, Heidelberg, 39–49.

Girard MC, Walter C, Rémy JC, Berthelin J, Morel JL (2010) Sols et environnement. Dunod : ADEME, Paris. 881 p.

Glasauer SM, Beveridge TJ, Burford EP, Harper FA, Gadd GM (2013) Metals and Metalloids, Transformation by Microorganisms. In: Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Elsevier, 438-447.

Gola D, Dey P, Bhattacharya A, Mishra A, Malik A, Namburath M, Ahammad S (2016) Multiple heavy metal removal using an entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. Bioresour Technol 218:388–396.

Gorospe J (2012) Growing Greens and Soiled Soil: Trends in Heavy Metal Contamination in Vegetable Gardens of San Francisco. Rapport de Master. Université d'état de San José. 125p.

Gouma S, Fragoeiro S, Bastos AC, Magan N (2014) 13 - Bacterial and Fungal Bioremediation Strategies. In: Das S (ed) Microbial Biodegradation and Bioremediation. Elsevier, Oxford, 301–323.

Gwaltney-Brant SM (2013) Heavy Metals. In: Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Elsevier, 1315–1347.

Hamdoun H (2013) Valorisation de sédiments de dragage en techniques routières et acceptabilité environnementale : caractérisation globale et études de mobilités d'éléments métalliques par extractions simples, séquentielles et cinétiques. Cas de sédiments de la Manche dans le cadre du projet SETARMS. Thèse de doctorat. Université Caen-Normandie. 295 p.

Hamdoun H, Leleyter L, Van-Veen E, Coggan J, Basset B, Lemoine M, Baraud F (2015) Comparison of three procedures (single, sequential and kinetic extractions) for mobility assessment of Cu, Pb and Zn in harbour sediments. Comptes Rendus Geosci 347:94–102.

Hassan SE, Hijri M, St-Arnaud M (2013) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on trace metal uptake by sunflower plants grown on cadmium contaminated soil. New Biotechnol 30:780–787.

He S, He Z, Yang X, Stoffella PJ, Baligar VC (2015a) Chapter Four - Soil Biogeochemistry, Plant Physiology, and Phytoremediation of Cadmium-Contaminated Soils. In: Sparks DL (ed) Advances in Agronomy. Academic Press, 135–225.

He Z, Shentu J, Yang X, Baligar V, Zhang T, Stoffella P (2015b) Heavy Metal Contamination of Soils: Sources, Indicators and Assessment. 21st Int Conf Environ Indic ICEI 2015.

Henderson L, Lilje E, Robinson K, Gleason FH, Lilje O (2017) Chapter 30 Effects of Toxic Metals on Chytrids, Fungal-Like Organisms, and Higher Fungi. In: Dighton J, White JF (eds) Mycology. CRC Press, CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742, 433–458.

Henderson L, Pilgaard B, Gleason FH, Lilje O (2015) Copper (II) lead (II), and zinc (II) reduce growth and zoospore release in four zoosporic true fungi from soils of NSW, Australia. Fungal Biol 119:648–655.

Holan ZR, Volesky B (1995) Accumulation of cadmium, lead, and nickel by fungal and wood biosorbents. Appl Biochem Biotechnol 53:133–146.

Horwath W (2015) Chapter 12 - Carbon Cycling: The Dynamics and Formation of Organic Matter. In: Paul EA (ed) Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition). Academic Press, Boston, 339–382.

INERIS (2006) Eléments en traces métalliques. Guide méthodologique. Recommandation pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. INERIS. 119 p.

Jaeckel P, Krauss G, Menge S, Schierhorn A, Rücknagel P, Krauss G-J (2005) Cadmium induces a novel metallothionein and phytochelatin in an aquatic fungus. Biochem Biophys Res Commun 333:150–155.

Jean J, Sirot V, Hulin M, Le Calvez E, Zinck J, Noël L, Vasseur P, Nesslany F, Gorecki S, Guérin T, Rivière G (2018) Dietary exposure to cadmium and health risk assessment in children – Results of the French infant total diet study. Food Chem Toxicol. 115:358–364.

Jean J, Sirot V, Vasseur P, Narbonne J-F, Leblanc J-C, Volatier J-L, Riviere G (2015) Impact of a modification of food regulation on cadmium exposure. RTP. 73:478–483.

Jeffery S, Gardi C, Jones A, Montanarella L, Marmo L, Miko L, Ritz K, Peres G, Römbke J et van der Putten WH (2010) Atlas européen de la biodiversité du sol. Commission Européenne, Bureau des publications de l'Union Européenne, Luxembourg. 130 p.

Jesenská Z, Piecková E, Bernát D (1993) Heat resistance of fungi from soil. Int J Food Microbiol 19:187–192.

Jiang J, Liu H, Li Q, Gao N, Yao Y, Xu H(2015) Combined remediation of Cd–phenanthrene co-contaminated soil by *Pleurotus cornucopiae* and *Bacillus thuringiensis* FQ1 and the antioxidant responses in *Pleurotus cornucopiae*. Ecotoxicol Environ Saf 120:386–393.

Jullien V, Gozalo C (2018) Pharmacologie des anti-infectieux : généralités sur les relations pharmacocinétique-pharmacodynamie. In: Pharmacologie des Anti-Infectieux. Elsevier, 3–7.

Kelly JM (2016) 13 The Regulation of Carbon Metabolism in Filamentous Fungi. In: Biochemistry and Molecular Biology. Springer, Cham, 321–340.

Kertesz MA, Frossard E (2015) Chapter 16 - Biological Cycling of Inorganic Nutrients and Metals in Soils and Their Role in Soil Biogeochemistry. In: Paul EA (ed) Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition). Academic Press, Boston, 471–503.

Khalid S, Shahid M, Niazi NK, Murtaza B, Bibi I, Dumat C (2016) A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. J Geochem Explor. 182:247–268.

Klich MA (2002) Biogeography of Aspergillus species in soil and litter. Mycologia 94:21–27.

Kothe E, Büchel G (2014) UMBRELLA: Using MicroBes for the REgulation of heavy metaL mobiLity at ecosystem and landscape scAle. Environ Sci Pollut Res 21:6761–6764.

Kubicek CP, Punt P, Visser J (2011) Production of Organic Acids by Filamentous Fungi. In: Industrial Applications. Springer, Berlin, Heidelberg, 215–234.

Kumar Yadav K, Gupta N, Kumar A, Reece LM, Singh N, Rezania S, Ahmad Khan S (2018) Mechanistic understanding and holistic approach of phytoremediation: A review on application and future prospects. Ecological Engineering 120:274–298.

Lal S, Ratna S, Said OB, Kumar R (2018) Biosurfactant and exopolysaccharide-assisted rhizobacterial technique for the remediation of heavy metal contaminated soil: An advancement in metal phytoremediation technology. Environmental Technology & Innovation 10:243–263.

Lanphear BP, Rauch S, Auinger P, Allen RW, Hornung RW (2018) Low-level lead exposure and mortality in US adults: a population-based cohort study. Lancet Public Health. 3-4:177-184.

Laperche V (2004) Guide méthodologique du Pb, appliqué à la gestion des sites et sols pollués. BRGM. 138 p.

Lebrun JD, Demont-Caulet N, Cheviron N, Laval K, Trinsoutrot-Gattin I, Mougin C (2011) Secretion profiles of fungi as potential tools for metal ecotoxicity assessment: A study of enzymatic system in Trametes versicolor. Chemosphere 82:340–345.

Lecointre G, Le Guyader H (2009) Classification phylogénétique du vivant. Belin, Paris. 559 p.

Lee Taylor D, Sinsabaugh RL (2015) The Soil Fungi. In: Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. Elsevier, 77–109.

Lejon DPH, Martins JMF, Lévêque J, Spadini L, Pascault N, Landry D, Milloux M-J, Nowak V, Chaussod R, Ranjard L (2008) Copper dynamics and impact on microbial communities in soils of variable organic status. Environ Sci Technol 42:2819–2825.

Leleyter-Reinert L (2017) Sols et sédiments pollués - Teneurs élémentaires totales et biodisponibles. Editions Universitaires Européennes. 68 p.

Leleyter L, Baraud F, Gil O, Goualis S, Lemoine M, Orvarin F (2016) Aluminium impact on the growth of bentic diatom in Marine sediments : Formations, Distributions and Environmental Impacts. Nova Sciences Publishers. 91-79.

Leleyter L, Baraud F (2005) Évaluation de la mobilité des métaux dans les sédiments fluviaux du bassin de la Vire (Normandie, France) par extractions simples ou séquentielles. Comptes Rendus Geosci 337:571–579.

Leleyter L, Probst JL (1999) A New Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Elements in River Sediments. Int J Environ Anal Chem 73:109–128.

Leleyter L, Rousseau C, Biree L, Baraud F (2012) Comparison of EDTA, HCl and sequential extraction procedures, for selected metals (Cu, Mn, Pb, Zn), in soils, riverine and marine sediments. J Geochem Explor 116–117:51–59.

Li Q, Wu S, Liu G, Liao X, Deng X, Sun D, Hu Y, Huang Y (2004) Simultaneous biosorption of cadmium (II) and lead (II) ions by pretreated biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. Sep Purif Technol 34:135–142.

Li X, Wang Y, Pan Y, Yu H, Shen X, Jiao X, Wu Y, La S, Yuan K, Zhang G (2017) Mechanisms of Cd and Cr removal and tolerance by macrofungus *Pleurotus ostreatus* HAU-2. J Hazard Mater 330:1–8.

Li X, Xu Q, Han G, Zhu W, Chen Z, He X, Tian X (2009) Equilibrium and kinetic studies of copper(II) removal by three species of dead fungal biomasses. J Hazard Mater 165:469–474.

Liu S, Yang C, Xie W, Xia C, Fan P (2012) The Effects of Cadmium on Germination and Seedling Growth of *Suaeda salsa*. Procedia Environ Sci 16:293–298.

Lodge D, Ammirati J, O'Dell T, Mueller G, Hundhorf S, Wang CJ, Stokland JN, Schmit JP, Ryvarden L, Leacock PR, Mata M, Umaña L, Wu Q, Czederpiltz DL (2004) 8 - Terrestrial and lignicolous macrofungi. In: Biodiversity of Fungi. Academic Press, Burlington, 127–172.

Lorenzo M, Moldes D, Sanromán M (2006) Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. Chemosphere 63:912–917.

Lucas J-P, Le Bot B, Glorennec P, Etchevers A, Bretin P, Douay F, Sébille V, Bellanger L, Mandin C (2012) Lead contamination in French children's homes and environment. Environ Res 116:58–65.

Marmeisse R, Girlanda M (2016) 10 Mycorrhizal Fungi and the Soil Carbon and Nutrient Cycling. In: Environmental and Microbial Relationships. Springer, Cham, 189–203.

Martins JMF (2008) Microbiogéochimie, transfert réactif et impact des micropolluants dans les sols. Approche couplée multi-échelles et modélisation., Univesité Joseph Fourier-Grenoble I. 112 p.

Matute RG, Serra A, Figlas D, Curvetto N (2011) Copper and Zinc Bioaccumulation and Bioavailability of *Ganoderma lucidum*. J Med Food 14:1273–1279.

Mench M, Baize D (2004) Contamination des sols et de nos aliments d'origine végétale par les éléments en traces - mesures pour réduire l'exposition. Courr. Environ. INRA N°52:31–56.

Miersch J, Tschimedbalshir M, Bärlocher F, Grams Y, Pierau B, Schierhorn A, Krauss G-J (2001) Heavy metals and thiol compounds in *Mucor racemosus* and *Articulospora tetracladia*. Mycol Res 105:883–889.

Mishra A, Malik A (2014) Novel fungal consortium for bioremediation of metals and dyes from mixed waste stream. Bioresour Technol 171:217–226.

Mohammadian E, Babai Ahari A, Arzanlou M, Oustan S, Khazaei SH (2017) Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanjan Province, Iran. Chemosphere 185:290–296.

Money NP (2016) Chapter 1 - Fungal Diversity. In: The Fungi (Third Edition). Academic Press, Boston 1–36.

Montanarella L, Badraoui M, Chude V, Costa Dos Santos Baptista I, Mamo T, Yemefack M, Singh Aulakh M, Yagi K, Young Hong S, Vijarnsorn P, Zhang GL, Arrouays D, Black H, Krasilnikov P, Sobocka J, Alegre J, Henriquez C, Mendonça-Santos M, Taboada M, Espinosa-Victoria D, AlShankiti A, AlaviPanah SK, El-Sheikh EAEM, Hempel J, Pennock D, Camps Arbestain M, McKenzie N (2015) The Status of the World's Soil Resources (Main Report). Food and agriculture organization of the united nations. 650 p.

Morgan CLS, McBratney AB, Field DJ, Koch A, Bouma J, Carré F (2017) Synthesis: Goals to Achieve Soil Security. In: Field DJ, Morgan CLS, McBratney AB (eds) Global Soil Security. Springer International Publishing, Cham, 457–462.

Mouchacca J (2007) Heat tolerant fungi and applied research: Addition to the previously treated group of strictly thermotolerant species. World J Microbiol Biotechnol 23:1755.

Nahmani J, Lavelle P (2002) Effects of heavy metal pollution on soil macrofauna in a grassland of Northern France. Eur J Soil Biol 38:297–300.

NCBI BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Consulté le 11.08.2017.

Nongmaithem N, Roy A, Bhattacharya P-M (2016) Screening of Trichoderma isolates for their potential of biosorption of nickel and cadmium. Braz J Microbiol 47:305–313.

Op De Beeck M, Lievens B, Busschaert P, Rineau F, Smits M, Vangronsveld J, Colpaert JV (2015) Impact of metal pollution on fungal diversity and community structures: Impact of metal pollution on fungal communities. Environ Microbiol 17:2035–2047.

Parlement Européen (2017) Point presse ordre du jour. Actualités. Parlement européen. http://www.europarl.europa.eu/news/fr/agenda/briefing/2017-10-23/9/favoriser-l-utilisation-dans-l-ue-de-fertilisants-organiques-et-plus-surs. Consulté le 19.11.2018.

Parton WJ, Del Grosso SJ, Plante AF, Adair EC, Lutz SM (2015) Chapter 17 - Modeling the Dynamics of Soil Organic Matter and Nutrient Cycling. In: Paul EA (ed) Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition). Academic Press, Boston, 505–537.

Paya Perez A, Pelaez Sanchez S, Joint Research Center (eds) (2017) European achievements in soil remediation and brownfield redevelopment. 208 p.

Pichard A, Bisson JM (2005) Cuivre et ses dérivés. INERIS. 66 p.

Pichard A, Bisson JM (2003) Plomb et ses dérivés. INERIS. 92 p.

Piou S, Bataillard P, Laboudigue A, Férard J-F, Masfaraud J-F (2009) Changes in the geochemistry and ecotoxicity of a Zn and Cd contaminated dredged sediment over time after land disposal. Environ Res 109:712–720.

Pitt JI (2000) Toxigenic fungi: which are important? Med Mycol 38 Suppl 1:17–22.

Pitt JI (1979) The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces. Academic Press, London; New York. 197 p.

Qian G, Chen W, Lim TT, Chui P (2009) In-situ stabilization of Pb, Zn, Cu, Cd and Ni in the multi-contaminated sediments with ferrihydrite and apatite composite additives. J Hazard Mater 170:1093–1100.

Quevauviller P, Rauret G, López-Sánchez J-F, Rubio R, Ure A, Muntau H (1997) Certification of trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 601) following a three-step sequential extraction procedure. Science of The Total Environment 205:223–234.

RoyChowdhury A, Datta R, Sarkar D (2018) Chapter 3.10 - Heavy Metal Pollution and Remediation. In: Green Chemistry. Elsevier, 359–373.

R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org/.

Rafin C, Veignie E, Woisel P, Cazier F (2015) Intérêt des champignons telluriques dans des processus de bioremédiation de sols pollués par des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Déchets, sciences et techniques. 33:7–11.

Renshaw JC, Robson GD, Trinci APJ, Wiebe MG, Livens FR, Collison D, Taylor RJ (2002) Fungal siderophores: structures, functions and applications. Mycol Res 106:1123–1142.

Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R, Delgado-Boada JM (2013) Fungal laccases. Fungal Biol Rev 27:67–82.

Robert V, Vu D, Amor ABH, van de Wiele N, Brouwer C, Jabas B, Szoke S, Dridi A, Triki M, Daoud SB, Chouchen O, Vaas L, de Cock A, Stalpers JA, Stalpers D, Verkley GJM, Groenewald M, dos Santos FB, Stegehuis G, Li W, Wu L, Zhang R, Ma J, Zhou M, Gorjón SP, Eurwilaichitr L, Ingsriswang S, Hansen K, Schoch C, Robbertse B, Irinyi L, Meyer W, Cardinali G, Hawksworth

DL, Taylor JW, Crous PW (2013) MycoBank gearing up for new horizons. IMA Fungus 4:371–379.

Robin A, Vansuyt G, Hinsinger P, Meyer JM, Briat JF, Lemanceau P (2008) Chapter 4 Iron Dynamics in the Rhizosphere: Consequences for Plant Health and Nutrition. In: Advances in Agronomy. Academic Press, 183–225.

Rodríguez-Eugenio N, McLaughlin M and Pennock D (2018). Soil Pollution: a hidden reality. Rome, FAO. 142 p.

Roudier P (2004) Techniques de réhabilitation des sites et sols pollués. Fiches de synthèse. In: Ref TIP800WEB - Environ. https://www-techniques-ingenieur-fr.ezproxy.normandie-univ.fr/base-documentaire/environnement-securite-th5/gestion-des-sites-et-sols-pollues-42440210/techniques-de-rehabilitation-des-sites-et-sols-pollues-fiches-de-synthese-g2670/. Consulté le 26.02.2018.

Roy-Gleizes CL (2016) Cadre réglementaire de la pollution des sols. In: Ref TIP800WEB - Environ. https://www-techniques-ingenieur-fr.ezproxy.normandie-univ.fr/base-documentaire/environnement-securite-th5/gestion-des-sites-et-sols-pollues-42440210/cadre-reglementaire-de-la-pollution-des-sols-g2520/. Consulté le 28.02.2018

Saussaye L (2012). Traitement des sols aux liants hydrauliques : aspects géotechniques et physico-chimiques des perturbations de la solidification. Thèse de doctorat. Université de Caen-Normandie. 381 p.

Sazanova K, Osmolovskaya N, Schiparev S, Yakkonen K, Kuchaeva L, Vlasov D (2015) Organic acids induce tolerance to zinc- and copper-exposed fungi under various growth conditions. Curr Microbiol 70:520–527.

Singh H (2006) Mycoremediation: fungal bioremediation. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J. 592 p.

Singh JS (2015) Microbes: The chief ecological engineers in reinstating equilibrium in degraded ecosystems. Agric Ecosyst Environ 203:80–82.

Song B, Zeng G, Gong J, Liang J, Xu P, Liu Z, Zhang Y, Zhang C, Cheng M, Liu Y, Ye S, Yi H, Ren X (2017) Evaluation methods for assessing effectiveness of in situ remediation of soil and sediment contaminated with organic pollutants and heavy metals. Environ Int 105:43–55.

Speight JG (2017) Chapter Five - Sources and Types of Inorganic Pollutants. In: Environmental Inorganic Chemistry for Engineers. Butterworth-Heinemann, 231–282.

Speight JG, El-Gendy NS (2018) Chapter 10 - Bioremediation of Contaminated Soil. In: Speight JG, El-Gendy NS (eds) Introduction to Petroleum Biotechnology. Gulf Professional Publishing, Boston, 361–417.

Stamets P (2005) Mycelium running: how mushrooms can help save the world. Ten Speed Press, Berkeley, Calif. 343 p.

Steinnes E (2013) Lead. In: Alloway BJ (ed) Heavy Metals in Soils. Springer Netherlands, Dordrecht, 395–409.

Stolte J, Tesfai M, Øygarden L, Kværnø S, Keizer J, Verheijen F, Panagos P, Ballabio C, Hessel R, European Commission, Joint Research Centre, Institute for Environment and Sustainability (2015) Soil threats in Europe. Publications Office, Luxembourg. 207 p.

Stucki JW, Lee K, Goodman BA, Kostka JE (2007) Effects of in situ biostimulation on iron mineral speciation in a sub-surface soil. Geochim Cosmochim Acta 71:835–843.

Sun L, Cao X, Li M, Zhang X, Li X, Cui Z (2017) Enhanced bioremediation of lead-contaminated soil by *Solanum nigrum* L. with *Mucor circinelloides*. Environ Sci Pollut Res 24:9681–9689.

Szebesczyk A, Olshvang E, Shanzer A, Carver PL, Gumienna-Kontecka E (2016) Harnessing the power of fungal siderophores for the imaging and treatment of human diseases. Coord Chem Rev 327–328:84–109.

Taboski MAS, Rand TG, Piorko A (2005) Lead and cadmium uptake in the marine fungi *Corollospora lacera* and *Monodictys pelagica*. FEMS Microbiol Ecol 53:445–453.

Tedersoo L, Bahram M, Polme S, Koljalg U, Yorou NS, Wijesundera R, Ruiz LV, Vasco-Palacios AM, Thu PQ, Suija A, Smith ME, Sharp C, Saluveer E, Saitta A, Rosas M, Riit T, Ratkowsky D, Pritsch K, Poldmaa K, Piepenbring M, Phosri C, Peterson M, Parts K, Partel K, Otsing E, Nouhra E, Njouonkou AL, Nilsson RH, Morgado LN, Mayor J, May TW, Majuakim L, Lodge DJ, Lee SS, Larsson K-H, Kohout P, Hosaka K, Hiiesalu I, Henkel TW, Harend H, Guo L -d., Greslebin A, Grelet G, Geml J, Gates G, Dunstan W, Dunk C, Drenkhan R, Dearnaley J, De Kesel A, Dang T, Chen X, Buegger F, Brearley FQ, Bonito G, Anslan S, Abell S, Abarenkov K (2014) Global diversity and geography of soil fungi. Science 346:1256688–1256688.

Tessier A, Campbell PGC, Bisson M (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. Analytical Chemistry 51:844–851.

Thion C, Cébron A, Beguiristain T, Leyval C (2012) Long-term in situ dynamics of the fungal communities in a multi-contaminated soil are mainly driven by plants. FEMS Microbiol Ecol 82:169–181.

Tóth G, Hermann T, Da Silva MR, Montanarella L (2016) Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. Environ Int 88:299–309.

Tremel-Schaub A, Feix I, France, Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie (2005) Contamination des sols: transferts des sols vers les plantes. EDP Sciences ; ADEME, Les Ulis [France]; Angers. 413 p.

Trevors JT, Stratton GW, Gadd GM (1986) Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. Can J Microbiol 32:447–464.

Ure AM, Quevauviller P, Muntau H, Griepink B (1993) Speciation of Heavy Metals in Soils and Sediments. An Account of the Improvement and Harmonization of Extraction Techniques Undertaken Under the Auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. International Journal of Environmental Analytical Chemistry 51:135–151.

US EPA O (2013) Framework for Metals Risk Assessment. In: US EPA. https://www.epa.gov/risk/framework-metals-risk-assessment. Consulté le 20.06.2017.

US EPA O (2014) Issue Paper on the Ecological Effects of Metals. In: US EPA. https://www.epa.gov/osa/issue-paper-ecological-effects-metals. Consulté le 20.06.2017.

Vasseur P, Bonnard M, Palais F, C Eom I, Morel J-L (2008) Bioavailability of chemical pollutants in contaminated soils and pitfalls of chemical analyses in hazard assessment. Environmental Technology. 23:652–656.

Velmurugan N, Hwang G, Sathishkumar M, Choi TK, Lee K-J, Oh B-T, Lee Y-S (2010) Isolation, identification, Pb(II) biosorption isotherms and kinetics of a lead adsorbing *Penicillium* sp. MRF-1 from South Korean mine soil. J Environ Sci 22:1049–1056.

Vimala R, Das N (2011) Mechanism of Cd(II) adsorption by macrofungus *Pleurotus platypus*. J Environ Sci 23:288–293.

Vincent M, Duval R, Hartemann P, Engels-Deutsch M (2017) Contact killing and antimicrobial properties of copper. J. Appl. Microbiol. 124:1032–1046.

Volesky B, Holan ZR (1995) Biosorption of Heavy Metals. Biotechnol Prog 11:235–250.

Von Arx JA (1974) The genera of fungi sporulating in pure culture. Cramer (eds). 282 p.

Voroney RP, Heck RJ (2015) Chapter 2 - The Soil Habitat. In: Paul EA (ed) Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition). Academic Press, Boston, 15–39.

Wang C, Ji J, Yang Z, Chen L, Browne P, Yu R (2012) Effects of Soil Properties on the Transfer of Cadmium from Soil to Wheat in the Yangtze River Delta Region, China—a Typical Industry–Agriculture Transition Area. Biol Trace Elem Res 148:264–274.

Warcup JH (1950) The Soil-Plate Method for Isolation of Fungi from Soil. Nature 166:117-118.

Watanabe T (2002) Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species, 2. ed. CRC Press, Boca Raton, Fla. 486 p.

Watkinson S, Boddy L, Money N (eds) (2016) The fungi, third edition. Academic Press, Amsterdam. 449 p.

Xiangliang P, Jianlong W, Daoyong Z (2005) Biosorption of Pb(II) by *Pleurotus ostreatus* immobilized in calcium alginate gel. Process Biochem 40:2799–2803.

Zafar S, Aqil F, Ahmad I (2007) Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. Bioresour Technol 98:2557–2561.

Zarei M, Hempel S, Wubet T, Schäfer T, Savaghebi G, Jouzani GS, Nekouei MK, Buscot F (2010) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil chemical properties and heavy metal contamination. Environ Pollut 158:2757–2765.

Zhang S, Zhang X, Chang C, Yuan Z, Wang T, Zhao Y, Yang X, Zhang Y, La G, Wu K, Zhang Z, Li X (2016) Improvement of tolerance to lead by filamentous fungus *Pleurotus ostreatus* HAU-2 and its oxidative responses. Chemosphere 150:33–39.

Zhang X, Wang X, Wei D, Li B, Ma Y, Huang Z (2013) The influence of soil solution properties on phytotoxicity of soil soluble copper in a wide range of soils. Geoderma 211–212:1–7.

Zotti M, Di Piazza S, Roccotiello E, Lucchetti G, Mariotti MG, Marescotti P (2014) Microfungi in highly copper-contaminated soils from an abandoned Fe–Cu sulphide mine: Growth responses, tolerance and bioaccumulation. Chemosphere 117:471–476.

Liste des normes utilisées

NF ISO 17402 – 2011 : Qualité du sol - Lignes directrices pour la sélection et l'application des méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des contaminants dans le sol et les matériaux du sol. 48 p.

NF ISO 10693 – 2014 : Qualité du sol - Détermination de la teneur en carbonate - Méthode volumétrique. 7 p.

NF ISO 14235 - 1998 : Qualité du sol -- Dosage du carbone organique par oxydation sulfochromique. 5 p.

NF ISO 10390 – 2005 : Qualité du sol -- Détermination du pH. 7 p.

NF ISO 11269-1 – 2013 : Qualité du sol - Détermination des effets des polluants sur la flore du sol - Partie 1 : méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines. 15 p.

NF EN 13656 – 2003 : Caractérisation des déchets - Digestion assistée par micro-ondes avec un mélange d'acides fluorhydrique (HF), nitrique (HNO_3) et chlorhydrique (HCl) pour la détermination ultérieure d'éléments contenus dans les déchets. 31 p.

Annexes

Annexe I : composition des milieux de culture

Les tableaux suivants regroupent les compositions détaillées des différents milieux de culture utilisés. Tous les milieux sont stérilisés à l'autoclave avant utilisation (120°C, 20 min).

Milieu MEA :

Extrait de malt (Difco®)	15 g
Agar	15 g
H_2O	qsp 1L

Milieu PDA :

Potato Dextrose extract (Difco®)	39 g
Agar	39 g
H_2O	qsp 1L

Milieu de Galzy et Slonimski (GS) :

Solution de sels minéraux	100 mL
Solution d'oligo-éléments	1 mL
Solution EDTA ferrique (200 $mg.L^{-1}$)	1 mL
Solution de vitamines	5 mL
Solution de mésoinositol (4 $mg.L^{-1}$)	5 mL
agar	15 g
H_2O	qsp 1L

Solution de sels minéraux :

$(NH_4)H_2PO_4$ (Sigma®)	60 g
$(NH_4)H_2SO_4$ (Sigma®)	20 g
K_2HPO_4 (Sigma®)	10 g
NaCl (Sigma®)	1 g
$CaCl_2$ (Sigma®)	1 g
$MgSO_4$, 7 H_2O (Sigma®)	5 g
H_2O	qsp 1L

Solution d'oligo-éléments :

H_3BO_3 (Sigma®)	0,4 g
$MnSO_4$ (Sigma®)	0,4 g
$ZnSO_4$ (Sigma®)	0,4 g
Na_2MoO_4 (Sigma®)	0,2 g
KI (Sigma®)	0,1 g
$CuSO_4$ (Sigma®)	0,04 g
H_2O	qsp 1L

Solution de vitamines :

Pantothénate de Ca (Sigma®)	0,4 g
Chlorhydrate de thiamine (Sigma®)	0,4 g
Inositol (Sigma®)	0,4 g
Pyridoxine (Sigma®)	0,4 g
Acide nicotinique (Sigma®)	0,1 g
Biotine (Sigma®)	0,004 g
H_2O	qsp 1 L

Milieu pour le dénombrement bactérien :

Extrait de levure (Difco®)	2,5 g
Tryptone (Sigma®)	5 g
Glucose (Sigma®)	1 g
Agar (Sigma®)	15 g
H_2O	qsp 1L

Annexe II : Protocoles détaillés de biologie moléculaire

1. Kit d'extraction d'ADN eucaryote NucleoSpin plant II® (Macherey-Nagel®)

Etapes détaillées du protocole :

Cultiver le micromycète sur une boîte de pétri recouverte d'un film de cellophane stérile.
Préparer un tube eppendorf « SafeLock » de 2 ml stérile et le remplir avec 1 g de billes de verre de 1 mm de diamètre et 2 billes de verre de 5 mm de diamètre.

Une fois la souche suffisamment poussée, gratter la surface de la boîte à l'aide d'un scalpel stérilisé à la flamme pour récupérer l'équivalent d'un petit pois de matière fongique, et le déposer dans l'eppendorf.

Ajouter 400 µl de PL1 (flacon du kit d'extraction).
Placer les tubes dans le Tissue Lyser et agiter 15 minutes à 20 Hz.
Incuber à 65°C pendant 15 minutes dans le grand bain-marie.
Ajouter 400 µl de Chloroforme et 20 µl de protéinase K.
Vortexer 30 secondes.

Centrifuger 5 minutes à 13.400 rpm sur la centrifugeuse de paillasse de la salle Extraction.
Récupérer la phase aqueuse (la phase supérieure) et la déposer dans une colonne de filtration violette. Faire bien attention à ne pas toucher à la phase inférieure.
Centrifuger 2 minutes à 13400 rpm.
Ajouter 450 µl de PC (flacon du kit d'extraction) au filtrat.
Vortexer 30 secondes.

Passer le mélange sur une colonne de rétention verte (volume maximal : 700 µl).
Centrifuger 1 minute à 13400 rpm.
Jeter le filtrat.

Laver la colonne avec 400 µl de PW1 (flacon du kit).
Centrifuger 1 minute à 13400 rpm.
Jeter le filtrat.

Laver la colonne avec 700 µl de PW2 (flacon du kit, vérifier la supplémentation en alcool avant utilisation).
Centrifuger 1 minute à 13400 rpm.
Jeter le filtrat.

Laver la colonne avec 700 µl de PW2.
Centrifuger 2 minutes à 13400 rpm.
Jeter le filtrat et le tube collecteur.

Placer la colonne sur un eppendorf propre de 1,5 ml.
Déposer 100 µl de tampon PE (aliquot du kit d'extraction) préalablement chauffé à 65°C et Laisser 5 minutes à température ambiante.
(L'élution peut se faire en deux étapes avec 50 µL afin d'améliorer le rendement d'extraction)

Centrifuger 2 minutes à 13400 rpm pour récupérer l'ADN dans le tube eppendorf.

Les extraits peuvent être dosé au Nanodrop®

Conserver les échantillons à -20°C.

2. Kit d'extraction d'ADN sol NucleoSpin soil® (Macherey-Nagel®)

L'étape de lyse cellulaire doit être un peu plus douce que pour les ADN purs.

Etapes détaillées du protocole :

Ce protocole a été adapté à partir du kit Macherey Nagel Nucleo Spin soil. Le kit propose plusieurs versions de protocoles. Deux tampons de lyses sont proposés (SL1 ou SL2), à utiliser chacun avec ou sans promoteur (SX). Il y a donc 4 possibilités de protocoles au total (SL1+SX ; SL1-SX ; SL2+SX et SL2-SX). Sur des sols pollués conservés à +4°C, le protocole SL1+SX a donné les meilleurs résultats. Il est cependant conseillé de faire un essai préalable afin de déterminer les meilleures conditions d'extraction pour de nouvelles matrices.

Mettre entre 250 et 500 mg d'échantillon de sol dans un tube avec des microbilles. [Les tubes fournis avec le kit contiennent des billes en céramique. Elles permettent d'absorber la libération de gaz de l'étape 4 mais favorise une remise en suspension après centrifugation et la contamination de l'extraction. Les billes en verre donnent de meilleures extractions à la condition de travailler proprement lors des étapes 4 et 5]
Ajouter 700 µL de SL1 ou SL2

Ajouter 150 µL de SX et placer les échantillons dans le Tissue lyser 5 min (à 15 min max), 20Hz. Une lyse trop forte peut diminuer la qualité de l'extraction. Si les échantillons sont pauvres en ADN, préférer une lyse de 5 min.

Centrifugeuse 13400 rp, 2 min
150 µL SL3
Vortex au moins 5s
Incuber entre 0-5°C, 5 min (Attention, les tubes sont sous pressions si vous utilisez des billes de verres : laisser les tubes ouverts car risque d'explosion).
Récupérer délicatement le surnageant et le déposer sur une colonne qui retient les impuretés (collerette rouge sur la colonne). Centrifugeuse 13400 rpm, 1 min.

250 µL SLB
Vortexer
Reprendre 550 µL (max) du filtrat sur une colonne qui retient l'ADN (collerette verte). Centrifugeuse 13400 rpm, 1 min. Reprendre si besoin le reste de l'échantillon et répéter l'opération.

Ajouter 500 µL SB, 13400 rpm, 30 s
Ajouter 550 µL SW1, 13400 rpm, 30 s
Ajouter 700 µL SW2, vortexer, 13400 rpm, 30 s
Ajouter 700 µL SW2, vortexer, 13400 rpm, 30 s
Jeter le filtrat entre chaque étape
Jeter le filtrat final
13400 rpm, 2 min

50 µL SE (le tampon d'élution SE doit être préalablement chauffer à 60°C puis revenu à température ambiante). Laisser reposer à température ambiante pendant 1 min sans fermer la colonne puis centrifuger à 13400 rpm, 30 s.

Répéter l'opération 1 à 2 fois permet d'améliorer significativement le rendement de l'extraction.

Les extraits peuvent être dosés au Nanodrop®.
Conserver les ADN extraits à -20°C.

Annexe III : séquences ITS obtenues par séquençage pour les 28 isolats de l'étude

Tableau 32 : liste des séquences ITS obtenues lors du séquençage des amplicons d'ADN des isolats de l'étude.

Espèce	Séquence ITS
Absidia cylindrospora	tnTCTTTGgggAgCTTTCTCTTCTTTTtATCtTGTGCACTGTTTTTATGGGTGGgnctcccTttGgggGGGTTCATCCGCCCTGGGCATGGCTA TTTTTTCCCTCGGGAGAATATTGGCCTGCCCAGTGCTCTTTCCTAACGGACTGGGCAACATTTTAACTATTCTGACTGAACCTAAcaAG AAAATTGTTAATCATAAACAACTTTCAGCAATGGATCTCTCGGCTTTCGTATCGATGAAGAACGCAGCAAATCGCGATATGTAGTGT GATCTGCCCATAGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCATCTTGCACCCCTGGGTATTCCTGGGGGGTACGCCTGTTTCAGTATCATTTAT ACTTCTCTCCCCCGAAAGGGTGTGCTGGGAAAAATCACTACTGGCCCCCGAGgAttTttttttggcgGnTTaAAnggtccggcntcCC
Agaricus arvensis	tgnnttctGCAaTTCAcATTAcTtATCGCATTTCgctGCGTTCTTcnncGATgCGAGagCCAagaGATCCGttGCTGaaaGTTGTATTAcAATTT TCaTAGGcaTAAGCCCATgTAAAgacATTcAaTGACaTtCGACAGAGTATAATGAGTGACATAGactCTGGTGAGAAAGTgATTTCATGA TCACATAAAgannaGCACCGTTTTnacAATGCAAGTCCTcacATCCAGCAaaTGCTGATAGAATGATCacTTCCTCCtaaCCcAACcAAAG ACTAcnntaGGTGcacAGGTGGATGAAAATGAaanCCAAACAGGCgtGcacATGCTCTAAAGagCcAGCTAcAaCCCATTTAGAaacATA ATTCAAaaTGAtCcTTCgcagntcnCcTACGg
Agaricus bisporus	non obtenue
Chaetomium atrobrunneum	ACGCGGAGGGACATTACAGAGTTGCAAAACTCCCAAACCATCGTGAACGCTACCTATATCGTTGCTTCGGCGGGCGGCGCGCCCGC GCCCTCGGCCCCCCGGGGGCCCGCCGGAGACCCAACAAACTCTTGAATTTTCGTGGCCTCTCTGAGTCTTCTGTACTGAATAAGTCA AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCATCAAGCCCCC GGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCGCGCCCGCAGGCCCTGAAAACCAGTGGCGGGCTCGCTGACCACACCGAGCGTAGTAGCATTTC TGTCTCGCTCAGGGCGTGCGGCGGGTTCCGGCCGTGAAACCCACCCCCCAAGGGGTACCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG AAGACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAGCCGGGAGGAAA
Chaetomium gracile	ACGCGGAGGGATCATTACAGAGTTGCAAAACTCCCTAAACCATCGTGAACGTTACCTTCGTCGTTGCTTCGGCGGGCGGCGCCCAG CGCGCCCCCCGGCCCCGCTCGCGGGGCGCCCGCCGGAGGTTACCTAACTCTTGACAATTGTATGGCCTCTCTGAGTCTCTGTACTTA ATAAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCATC AAGCCCCCGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGCCCGCAGGCCCTGAAAACCAGTGGCGGGCTCGCTGTCACACCGAGCGTAGTA GCATACACCTCGCTCAGGGCGTGCTGCGGGTTCCGGCCGTTAAAAGCCACATCTTTACCCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAA GACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAA
Coniochaeta hoffmanii	CGCGGAGGGACATTAAAGAAGCCGAAAGGCTACTTAAAACCATCGCGAACACGTCCAAGTTGCTTCGGCGGCGCGGGGCCCCTTCC CGGGGCGCCGCTGCCCTCCGCCCCCGGGTCTCCGGGAGGTGCGGGGCGCCCGCCGGAGGTACGAAACTCTTATGTATCACAGTGG CATCTCTGAGTGAAAAACAAATAAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGGCAGTACTCTGCCGGGCATGCCTGTT CGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCTGCTTGGTGTTGGGGCCCTACGGCTGCCGTAGGCCCTGAAAGGAAGTGGCGGGCTCGCTG CAACTCCGAGCGTAGTAACTCATTATCTCGCTAGGGACGTTGCGGCGCGCTCCTGCCGTTAAAGAACCCATCTTTAACCAAGGTTGA CCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGCCCGGAGGAA
Coprinellus micaceus	GACTGCGGAGACATTAACGAATAACTATGGTGTCTTGGTTGTAGCTGGCTCCTCGGAGCATTGTGCACGCCCGCCATTTTTATCTACC CACCTGTGCACCGACTGTAGGTCTGGATGACTCTCGTGCTCTCTGAGTGCGGATGCGAGGATTGCCCTCTTTGAGGTGTCTCTCCTC GAATTTCCAGGCTCTACGTCTTTTTACACACCCCAAAAGTATGATATAGAATGTAGTCAATGGGCTTGATCGCCTATAAAACACTATA CAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG AATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACCTCACCC GTTTTCTGAACGGTTCTCCGAGGCTTGGATGTGGGGGTTTGTGCAGGCTGCCTCAGCGCGGTCTGCTCCCCTGAAATGCATTAGCGA GTTCGTACTGAGCTCCGTCTATTGGTGTGATAATTATCTACGCCGTGGGCAGGGTTTAGACTCGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAA TACCTTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAGGGGGGGGAGGA
Coprinellus xanthothrix	TGCGGAGGATCATTACGAGTAACTATGGTGTCTCAGGTTGTAGCTGGCTCCTCGGAGCAATGTGCACGCCCGCCATTTTTATCTTTCC ACCTGTGCACCGACTGTAGGTCTGGATACCTCTCGCCGCAAGGCGGATGCGAGGGTTGCTCGTAAAGGGCTCCCCTCGAACTTCCA GGCTCTACGTCTTTTTACACACCCCAATAGTATGATGCAGAATGTAGTCAATGGGCTTCACAGCCTATAAAACACTATACAACTTTCA GCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG AATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACCTCACCCGTTTTCTGA ACGGGGTCGAGGCTTGGATGTGGGGGTTTGTGCAGGCTGCCTTCACTGGCGGTCTGCTCCCCTGAAATGCATTAGCGAGGTTCATG CTGAACTTCCGTCTATTGGTGTGATAATTATCTACGCCGTGGACGAGGATCAGACTCGCTTCTAACCGTCCGCGAGGACAATACCTT GACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAGGCCCGGAGGAAAA
Emericellopsis minima	ACTGCGGAGGATCATTACTGAGTTATCCAACTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATGTTGCTTCGGCGGGTCGTCCCGCGGCGCGC CCTCGTGGCGTGACCCGGACCCAGGCGCCCGCCGGGGAACCAAACTCTTGTCTTCCAGTGTCTCCTCTGAGTGGCATAAGCAAAAAT AAACAAAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCATTTCAACCCTCAGC CCCCGTTCGCGGGGCGCTGGCGTTGGGGCCCGGCCGTCCTCGCGGCGGCCGTCCCCGAAACACAGTGGCGGTCTCCCGCAAACTCC CCTGCGTAGTAGCACTACCTCGCAGAAGGGACGAGCGGGCTGGCCACGCCGTAAAACACCCCACTTCTCCAGGTTGACCTCAGATC AGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAACATATCAATAAGCCGGAGGAAA
Fomes fomentarius	non obtenue

Ganoderma resinaceum	GTGCGGAGATCATTATCGAGTTTTGACTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACACCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGC ACTTACTGTGGGTTCCAGACGTTGTGAAGCGGGCTCTTTACGGAGCTTGTAAAGCGGCGTGCCTGTGCCTGCGTTTATCACAAACTC TATAAAGTATTAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAA CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCG AGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAAATCTTCAACTTACAGACCTTTGCGGGTTTGTAGGCTTGGACTTTGGAGGCTTGTCGGCC ATGTTTTGGTCGGCTCCTCTTAAATGTATTAGCTTGATTCCTTGCGGATCGGCTCTCGGTGTGATAATGTCTACGCCGCGACCGTGAA GCGTTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCTCGTTTGTGAGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTA AGCATATCAAAAGGCCGGAAGGAAA
Humicola fuscuoatra	CGCGGAGGGACATTACAGAGTTGCAAAACTCCCTAAACCATTGTGAACGTTACCTAAACCGTTGCTTCGGCGGGCGGCCCGGGTCC TGCCCGGCGCCCCTCGGCCCTCGCGGGCGCCCGCCGGAGGAAAACCAAACTATTGCATTGTATGGCCTCTCTGAGTCTTCTGTACTG AATAAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA GAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCAT CAAGCCCCGGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGCCGCAGGCCCTGAAATGCAGTGGCGGGCTCGCTGTCACTCCGAGCGTAGTA GTTACATCTCGCTCTGGGCGTGCTGCGGGTTCCGGCCGTTAAAAGCCTTATTTACCCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAGACC CGCTGAACTTAAGCATATCAAAAGCCGGGAGGAA
Humicola sp	GCGGGGACATTACAGAGTTGCAAAACTCCCAAACCATTGTGAACGTTACCTATCCCGTTGCTTCGGCGGGCGGCCCGGGCCCCGTG CCCGGCGCCCCCCGGCCCCTCGCGGGCGCCCGCCGGAGGTAAACCAAACTCTTGAATTGTATGGCCTCTCTGAGTCTTCTGTACTGA ATAAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCATC AAGCCCCCGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGCCGCAGGCCCTGAAAACCAGTGGCGGGCTCGCTAGTCACTCCGAGCGTAGTAG TTACATCTCGCTCAGGGCGTGCTGCGGGTTCCGGCCGTTAAAAGCCTTATTTACCCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAGACCC GCTGAACTTAAGCATATCAATAGGCCGGAGGAAAATTGTCCCACATG
Irpex lacteus	ACTGCGGAGATCATTATCGAGTTTTGAACGGGTTGTAGCTGGCCTCTCACGAGGCATGTGCACGCCTGGCTCATCCACTCTTAACCT CTGTGCACTTTATGTAAGAGAAAAAAATGGTGGAAGCTTCCAGGATCTCGCGAGAGGTCTTTGGTTGAACAAGCCGTTTTTCTTTCT TATGTTTTACTACAAACGCTTCAGTTATAGAATGTCAACTGTGTATAACACATTTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCT CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGC ACTCCTTGGTATTCCGAGGAGTATGCCTGTTTGAGTCTCATGGTATTCTCAACCCCTAAATTTTTGTAACGAAGGTTTAGCGGGCTTG GACTTGGAGGTTGTGTCGGCCCTTGTCGGTCGACTCCTCTGAAATGTATTAGCGTGAATCTTACGGATCGCCTTCAGTGTGATAATTA TCTGCGCTGTGGTGTTGAAGTATTTATGGTGTTCATGCTTCGAACCGTCTCCTTGCCGAGACAATCATTTGACAATCTGAGCTCAAAT CAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAACCCCGGAGGG
Laetiporus sulphureus	non obtenue
Megacollybia platyphylla	tccaaaGcgnaGATAaTTATcacaaccaaggataGcccAactgancGggTTC
Penicllium oxalicum	TACTGCGGAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATCGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCG CCTCACGGCCGCCGGGGGGCATCTGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACACAAACGAACTCTTGTCTGAAGATTGCAGTCTG AGTACTTGACTAAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGT CATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTCTCGCCCCCCGCTTCCGGGGGGCGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGC GTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCCGCCGGCGAACACCATCAATCTTAACCAG GTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGCCGGAGGAA
Perenniporia fraxinea	ACTGCGGAGATCATTATCGAGTTTTGAAAGGGGTTGTAGCTGGCCTTCAGAGGCATGTGCACGCCCCGCTCAATCCACTCTACACCT GTGCACTTACTGTGGGTTTCGGAGGTGAAGCGTGCTTTCGCTCGCGGATCTAACGGGCCCGCGTTTTACTACAAACACTTTAAAGTA AACGAACGTGTGTCGCGACGTAACGCGTCTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGA AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCAT GCCTGTTTGAGTGTCATGAAATTCTCAACCTTACCGGTCTTTGCAGATCGGGTAAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTCGGCCTTGTGG TCGACTCCTCTCAAATGCATTAGCCTGGTTCCTTGCGGATCGGCTCTCGGTGTGATAATTGTCTACGCCGCGACCGTGAAGCGTTTGG CTGGCTTCTAACCGTCTCGATGGAGACAGCTTTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT AGCCGGGAGGAAA
Petriella sp	GACGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATTACTCCAAACCCTTTGTGAACCTTACCTTTTTGTTGCTCGGCGCACCGCGGGCCGCGGCT CCGGCCCGTCCCGCAGCGCGCCAGAGGACCCAACTCTTCAATTTATAGCGTACCTTCTGATTTACAAAACAAACAAGTTAAAACTTTC AACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGGCAGTAATCTGCCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCACCCCTCGAGCCGCTTTTAGTG GATCGGTGTTGGGGCACTACGGTAAAACGTAGGCCCCGAAATGAAGTGGCGGTCCCGCCGCGGTGCCCCCATGCGTAGTAACGTCT AGTCTCGCATCGGGTCCCGGCGGAGGCCTGCCGTCAAGCCTATTTATTCTCAGAATAGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGTTACCCG CTGAACTTAAGCATATCAATAAGGCGGAGGAA
Phaeophlebiopsis peniophoroides	TTGAAGGGGTTGTAGCTGGTCTCAATTAAGGGACATGTGCACACCTCACTCATCCACTCTCAAACCTCTGTGAACTTATTGTAGGTCG GTGAAAGGCTTGGTTTTAATTAATCAGGTTGGAAGCCTTCCTATGTTTTTACTACAAACGCTTTAGTTATAGAATGTCATACGCGTAT AACGCATTTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCACCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCCTGGTATTCCGGGGAGCATGCCTGTTTGAGTATCATGGAA TTCTCAACCTTCAATACTTTTTTTTAAAAGAGTGTCGAAGGCTTGGACTTGGAGGCTTTGTGCTGGCTCTGTATTGAGTCGGCTCCTCT GAAATGTATTAGCGTGAATCACTATGGATCGCTTCGGTGTGATAATTATCTGCGCCGTGGTCGTGAAGTATTAATTCAAGTTCGCGC TTCTAATCGTCCTTCACGGGACAATTACATTGAACTTTTGATCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAG GCGGGAGGAA
Pleurotus ostreatus	GAgtgntaattntCACATCAtgcgcagaGgcnnnnngangt
Pleurotus pulmonarius	non obtenue

Psathyrella candolleana	GCGGAGACATTAACGAATATCTATGGCGTTGGTTGTAGCTGGCTCCTAGGAGCATTGTGCACGCCCGTCATTCATATCTTTCCACCTG TGAACCATTTGTAGGCCTGGATACCCCTCGCTTTGGCAACAAAGCGGATGCAAGGATTGCTGCGTCGACAAGGCCGGCTCTCTTTGA ATTTCCAGGTTCTATGTCTTTTACACACCCCATTCGAATGATTTTAGAATGTAGTCAATGGGCTTTCATGCCTATAAAAAACTATACAA CTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT CATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACCTCACCAGTTT TGTAACGAGACAGGTGAAGGCTTGGATGTGGGGGTTTTGCAGGCTGCCTCAGTGCTGGTCTGCTCCCCTGAAATGCATTAGCGAGC TCATACTGAGCTTCCGTCTACTGGTGTGATAATTATCTACGCCGTGGATTGGACTCATGCTTGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAATT TACTTGACCAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGCCGGAGGAAA
Pseudeurotium bakeri	GCGGAGATCATTAAGAGACGTTGCCCTTCGGGGTATACCTCCCACCCTTTGTTTATTATACCTTTGTTGCTTTGGCGGGCCCGTCCTC GGACCACCGGCTTCGGCTGGTCAGTGCCCGCCAGAGGACCTAAAACTCTGTTTGTTCATATTGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAA ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCT TGGTATTGGGCTCTGCCGGTCCCGGCAGGCCTTAAAATCAGTGGCGGTGCCATTCGGCTTCAAGCGTAGTAATTCTTCTCGCTTTGG AGACCCGGGTGCGTGCTTGCCAGCAACCCCCAATTTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT CAAAAGGCCGGAGGAA
Schizophyllum commune	GCCTTCACGGGCGGCGGTTGACTACGTCTACCTCACACCTTAAAGTATGTTAACGAATGTAATCATGGTCTTGACAGACCCTAAAAA GTTAATACAACTTTCGACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATACCATCA ACCCTCTTTTGACTTCGGTTTCGAGAGTGGCTTGGAAGTGGAGGTCTGCTGGAGCCTAACGGAGCCAGCTCCTCTTAAATGTATTAG CGGATTTCCCTTGCGGGATCGCGTCTCCGATGTGATAATTTCTACGTCGTTGACCATCTCGGGGCTGACCTAGTCAGCTTCAATAGGA GTCTGCTTCTAACCGTCTCTTGACCGAGACTAGCGACTTGTGCGCTAACTTTTGACTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGA ACTTAAGCATATCAATAAGCGGAG
Sordaria lappae	CGCGGAGGGACATTACAGAGTTGCAAACTCCAACAAACCATCGCGAATCTTACCCGTACGGTTGCCTCGGCGCTGGCGGTCCGGAA GGCCCTCGGGCCCCCGGATCCTCGGGTCTCCCGCTCGCGGGAGGCTGCCCGCCGGAGTGCCGAAACCAAACTCTTGATATTTTATGT CTCTCTGAGTAAACTTTTAAATAAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCTCGCCAGTATTCTGGCGAGCATGCCTGTTC GAGCGTCATTTCAACCATCAAGCTCTGCTTGCGTTGGGGATCCGCGTCTGACGCGGTCCCTCAAAAACAGTGGCGGGCTCGCTAGTC ACACCGAGCGTAGTAACTCTACATCGCTATGGTCGTGCGGCGGGTTCTTGCCGTAAAACCCCCAATTTCTAAGGTTGACCTCGGATC AGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGCCGGAAGAA
Xylaria sp	GAGGGACATTAAGAGAGTATAAAACTCCCTAACCCATGTGAACTTACCACTGTTGTTGCCTCGGCAGGTTGTGTTATACCGTGTCGT CAGGCACGGGATAGCCCTGCCTGCCGGTGGCCTATTAAATTCTGTTTATTATATTATTCTGAACCTAAATAAGAAATTATTAAAACTT TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTCTGTTGCTT AGCGTTGGGGGCCTACAGCTTTTAGCTGTAGCTCCCTAAATTGAGTGGCGGAATCGGTTCACGCTCTAGATGTAGTAATTATTTTTA ATCTCGCCTAGAGCTGCCCCGATTTCCTGCCGTAAAACCCCCTACTTTTTAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAA CTTAAGCATATCAATAAAGCGGGAGGAAAA

Annexe IV : profils de tolérance au stress induit par Cd, Cu et Pb pour les 28 isolats fongiques de l'étude

Afin de simplifier la lecture des planches, la légende présentée ci-dessous a été utilisée pour les différents isolats soumis aux différents stress métalliques. Si la croissance d'un isolat était totalement inhibée par une concentration, cet isolat était transféré sur un nouveau milieu sans métal afin d'évaluer le caractère fongicide ou fongistatique de cette dose. Ces courbes sont représentées par les symboles colorés en noir.

Légende :

× Témoin sans métal

◇ 10 $mg.L^{-1}$

△ 50 $mg.L^{-1}$

○ 100 $mg.L^{-1}$

□ 1000 $mg.L^{-1}$

◆ 10 $mg.L^{-1}$, transfert sur milieu sans métal

▲ 50 $mg.L^{-1}$, transfert sur milieu sans métal

● 100 $mg.L^{-1}$, transfert sur milieu sans métal

■ 1000 $mg.L^{-1}$, transfert sur milieu sans métal

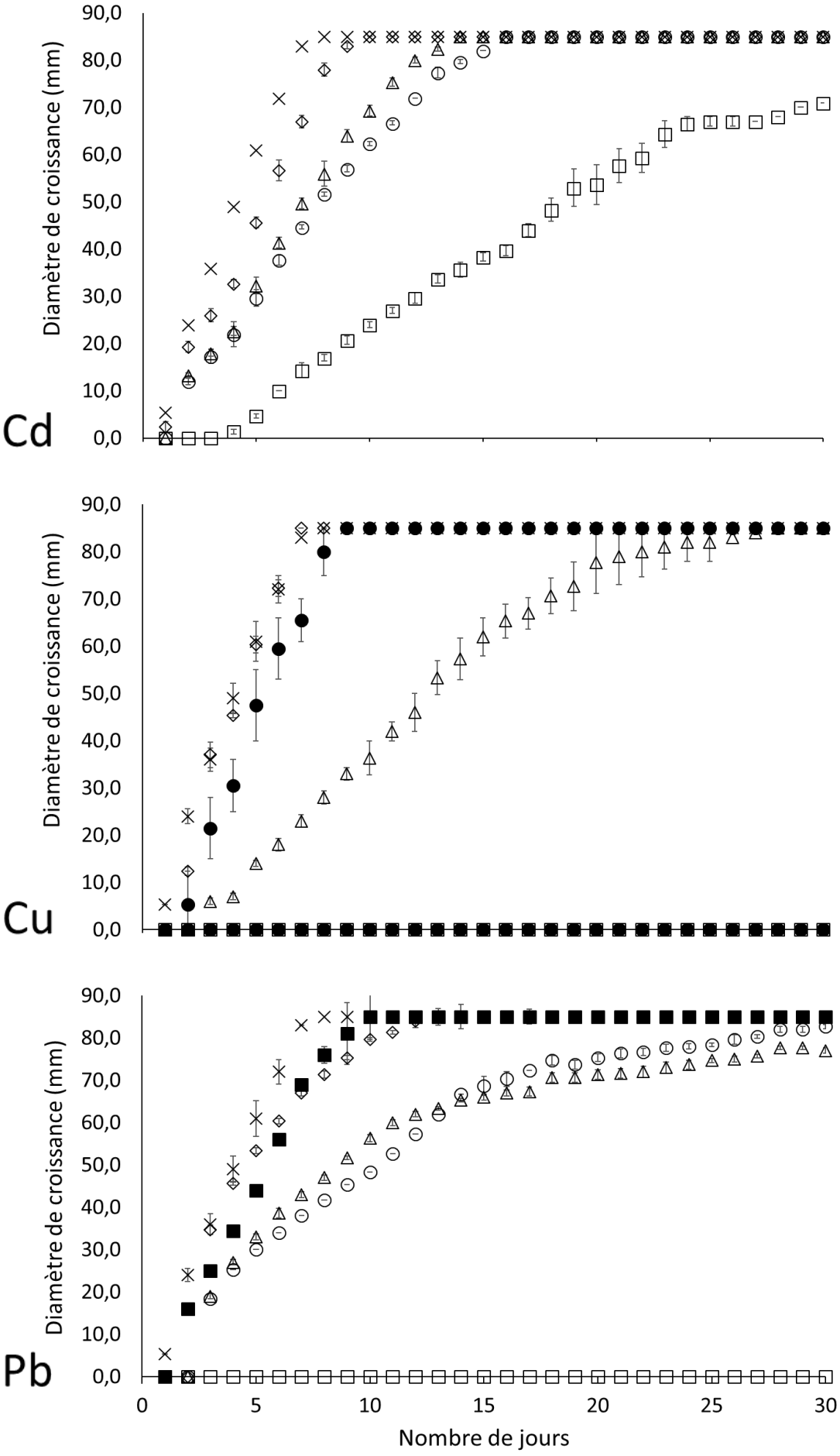


Figure 38 : profil de tolérance d'Absidia cylindrospora en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

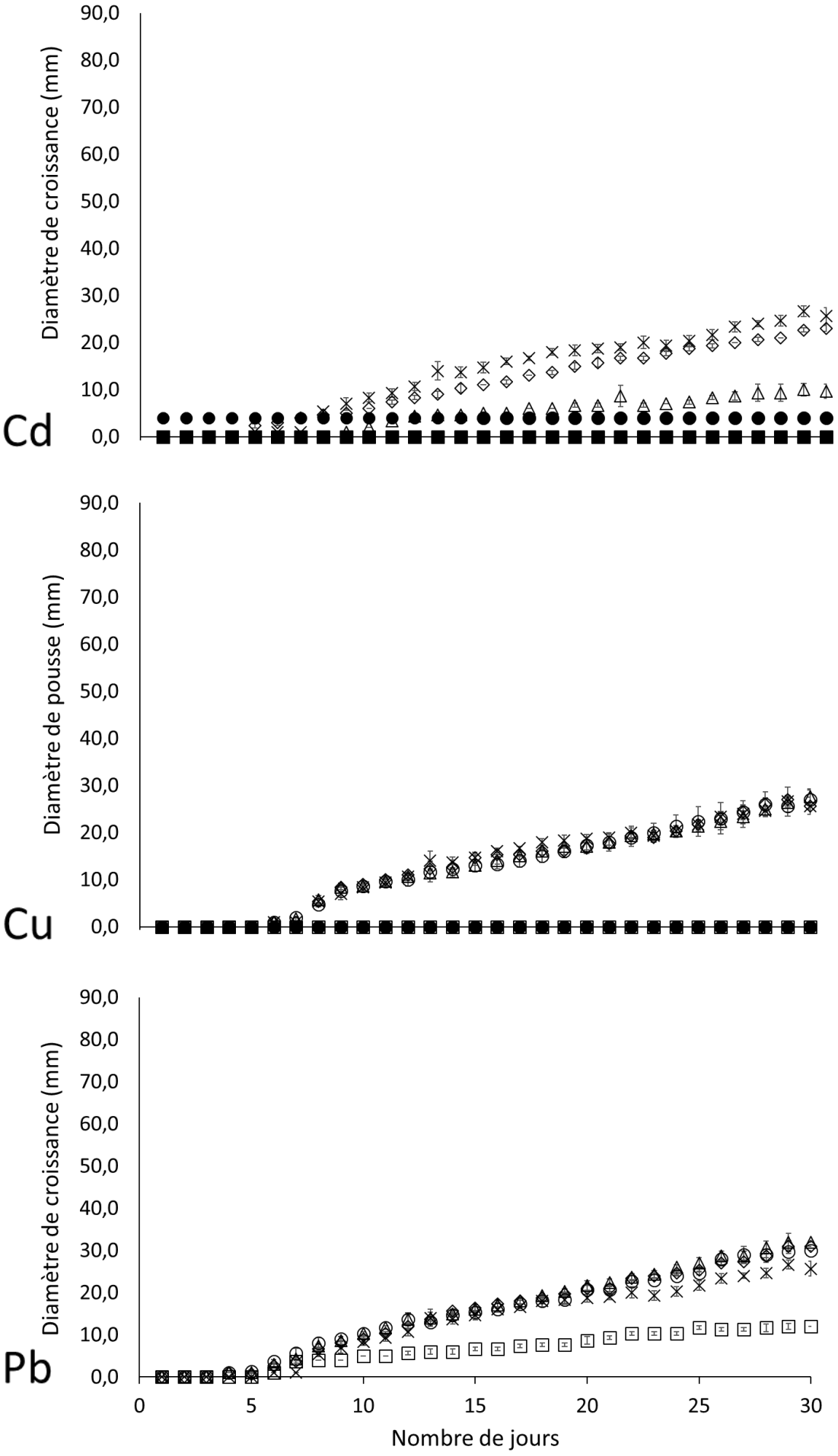


Figure 39 : profil de tolérance d'Agaricus arvensis en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

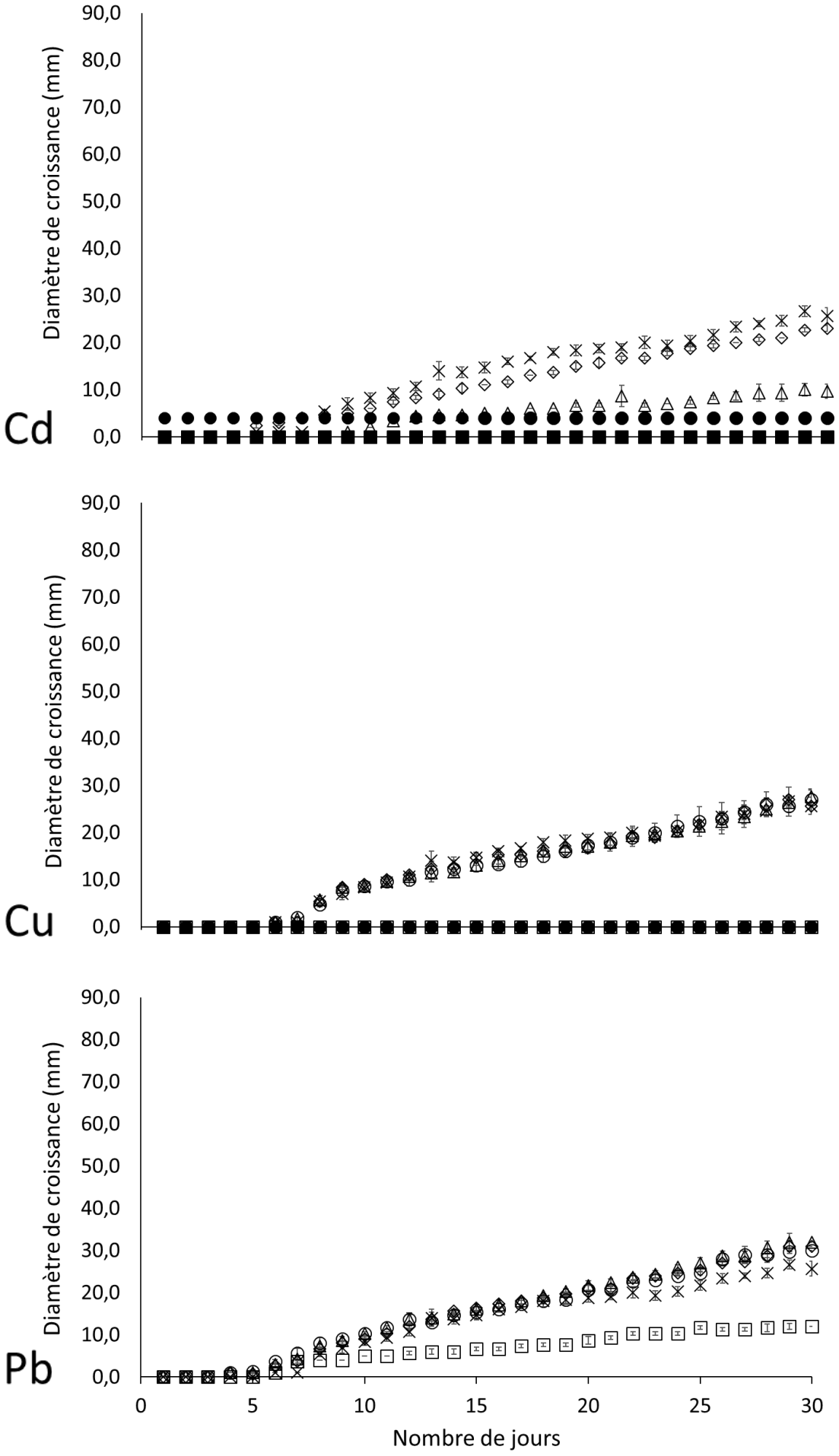


Figure 40 : profil de tolérance d'Agaricus bisporus en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

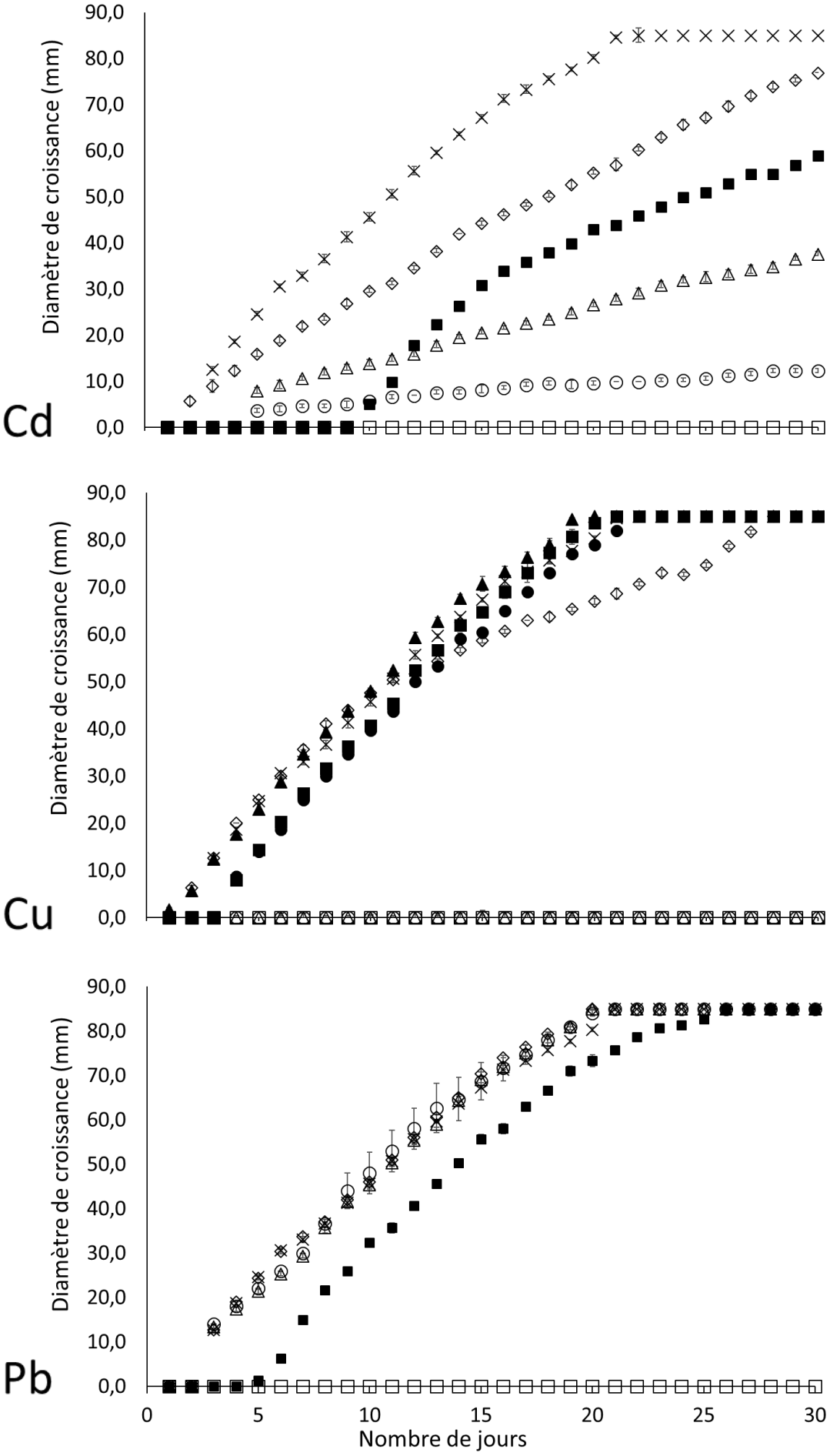


Figure 41 : profil de tolérance de Chaetomium atrobrunneum en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

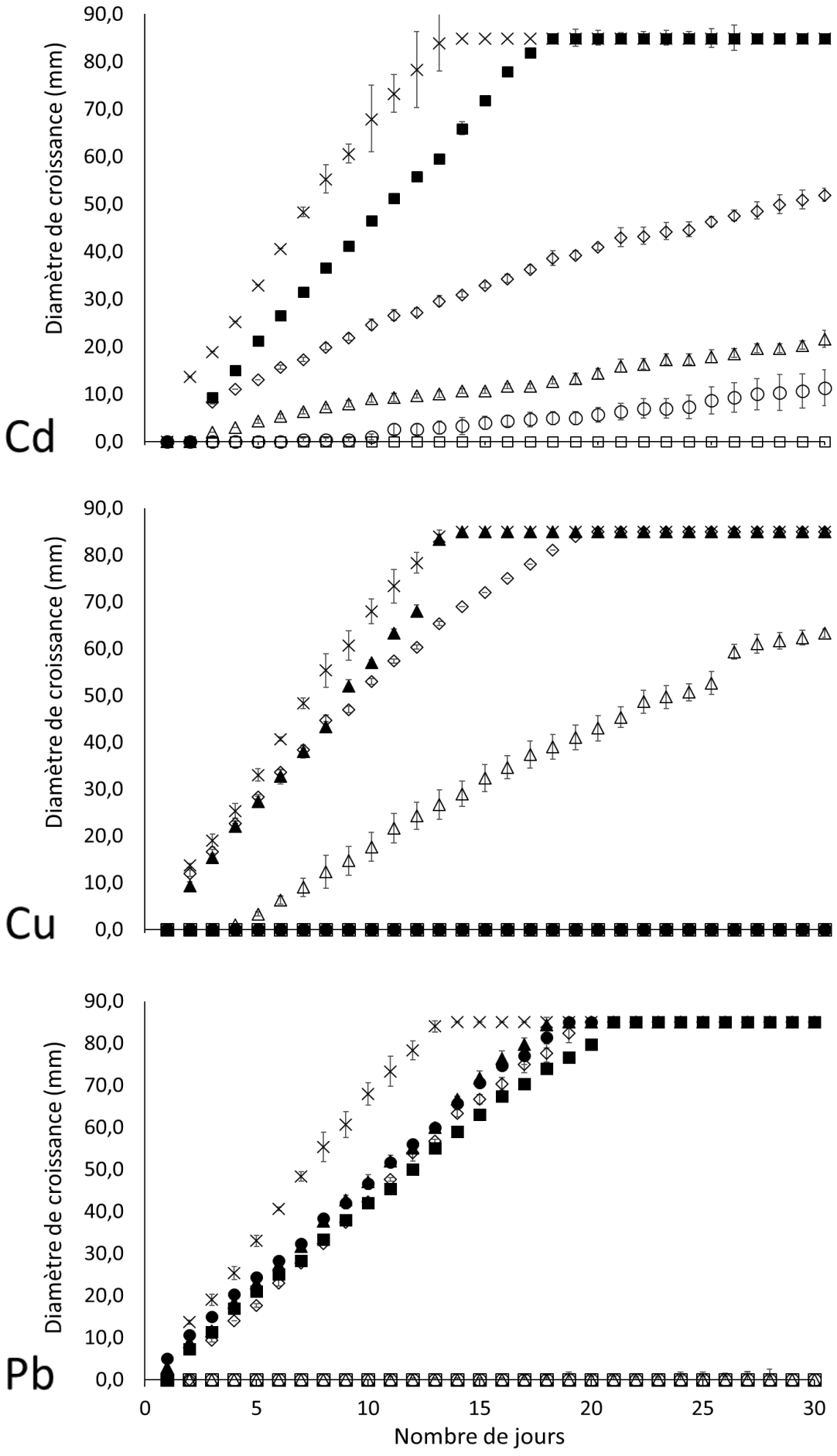


Figure 42 : profil de tolérance de Chaetomium gracile en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

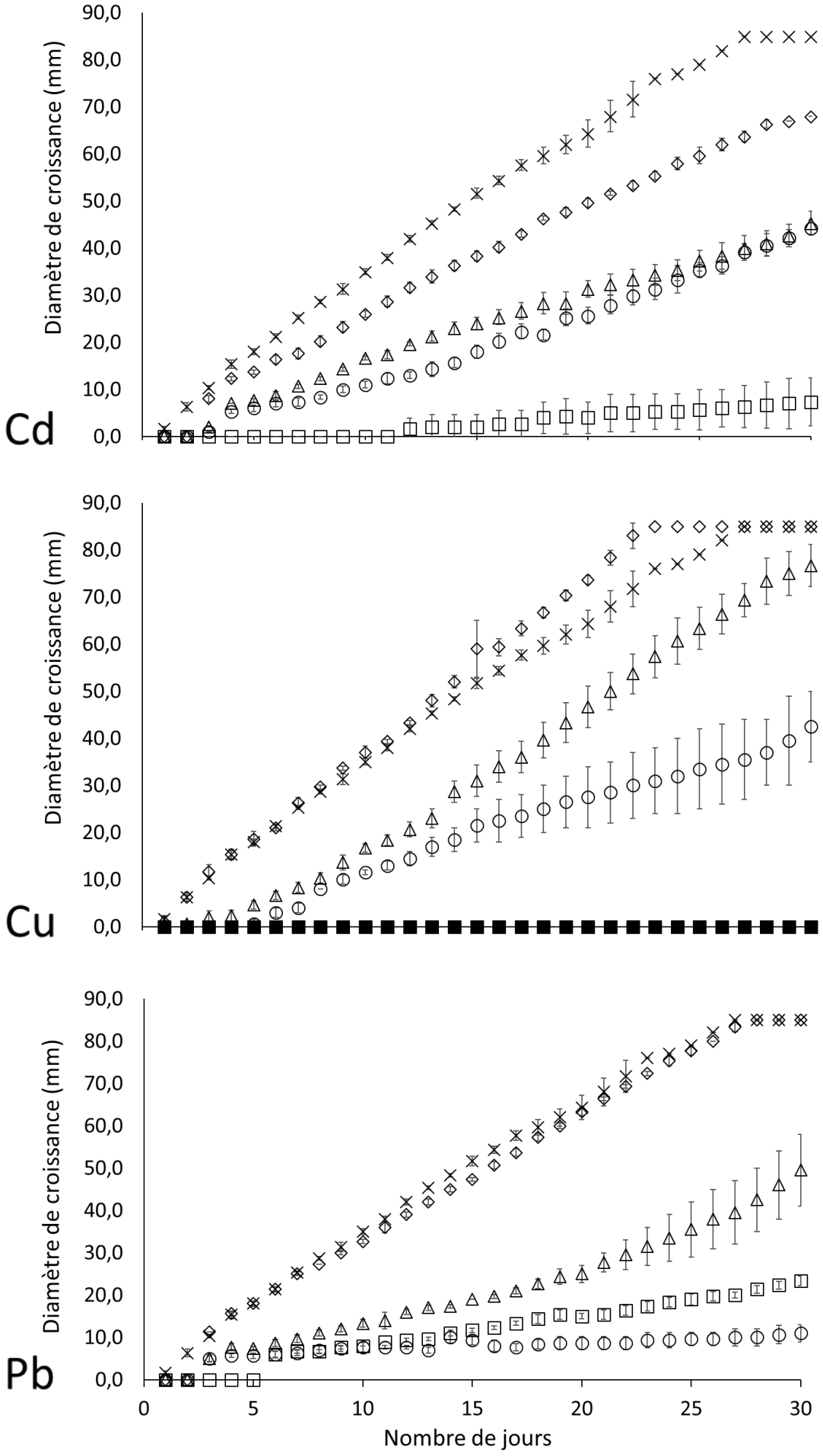


Figure 43 : profil de tolérance de Coniochaeta hoffmanii en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

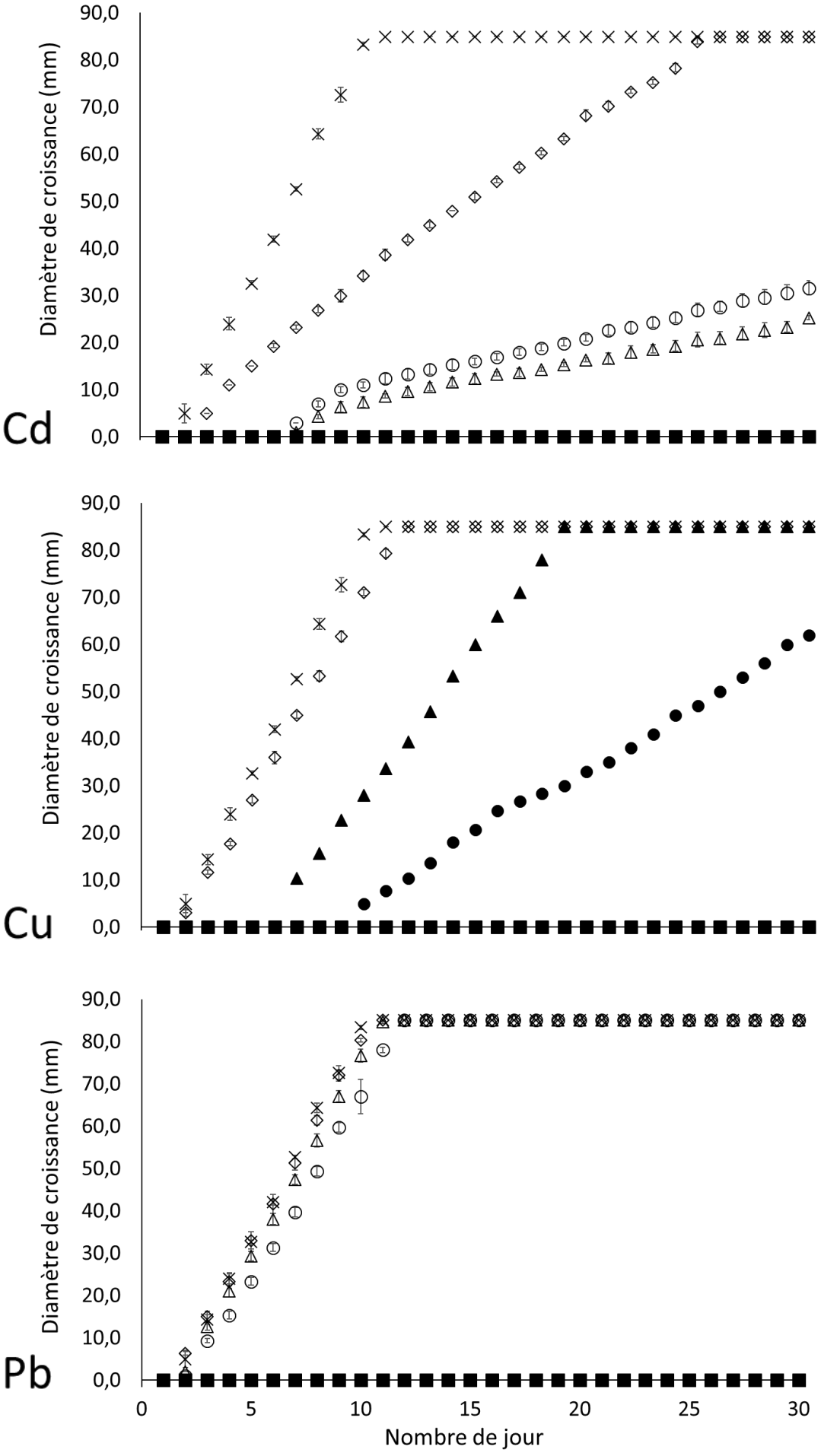


Figure 44 : profil de tolérance de Coprinellus micaceus en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

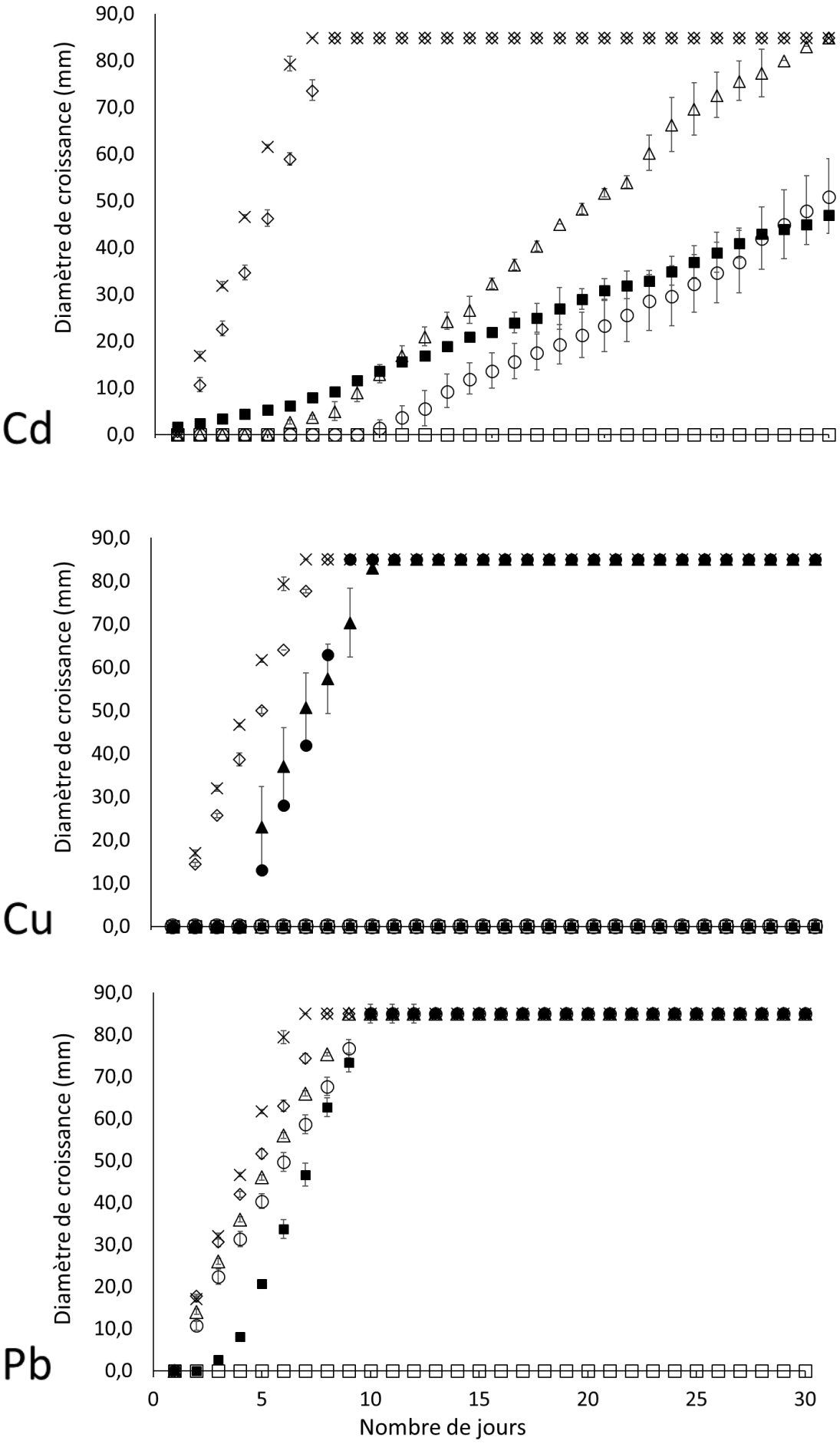


Figure 45 : profil de tolérance de Coprinellus xanthothrix en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

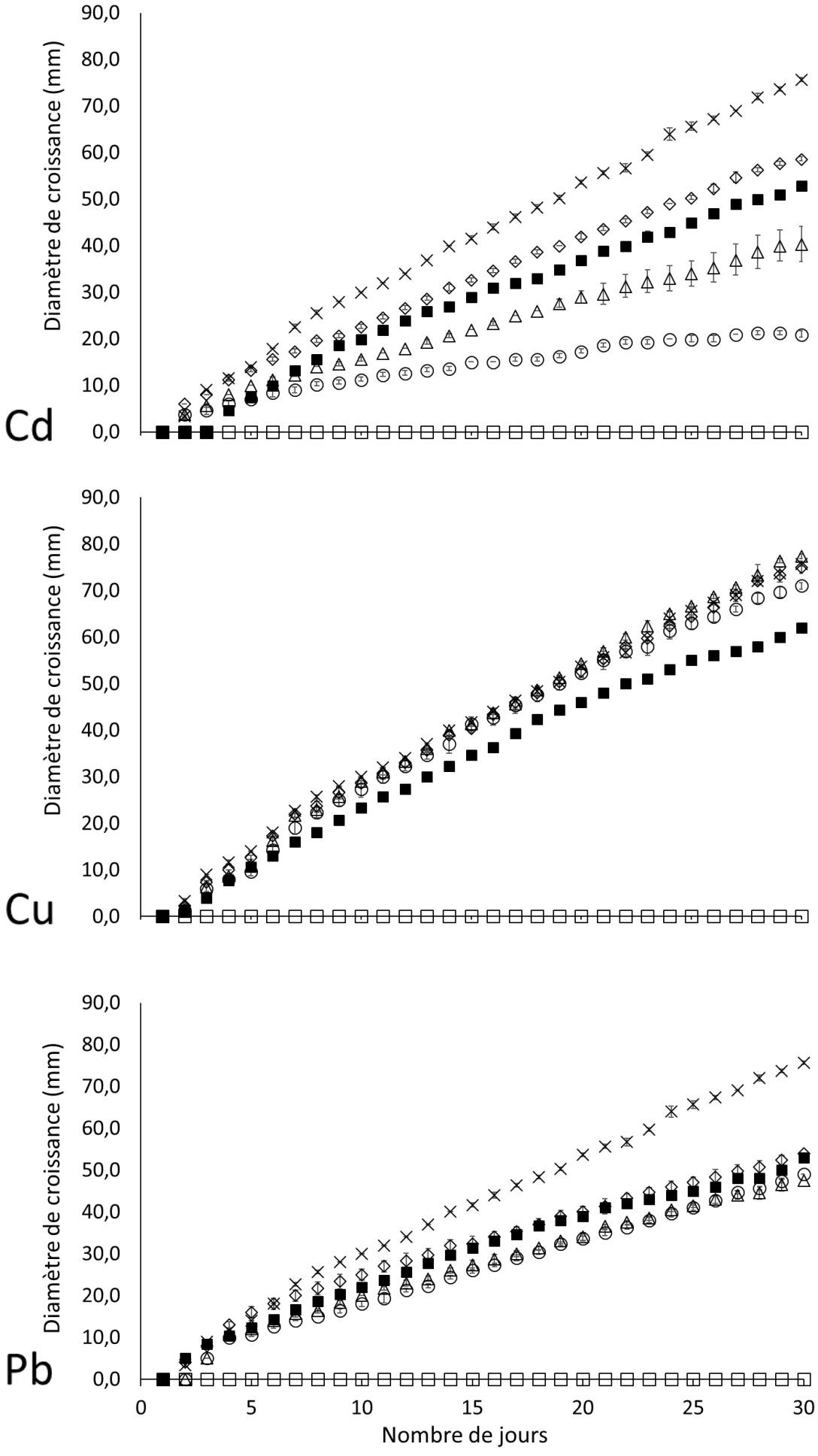


Figure 46 : profil de tolérance de Emericellopsis minima en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

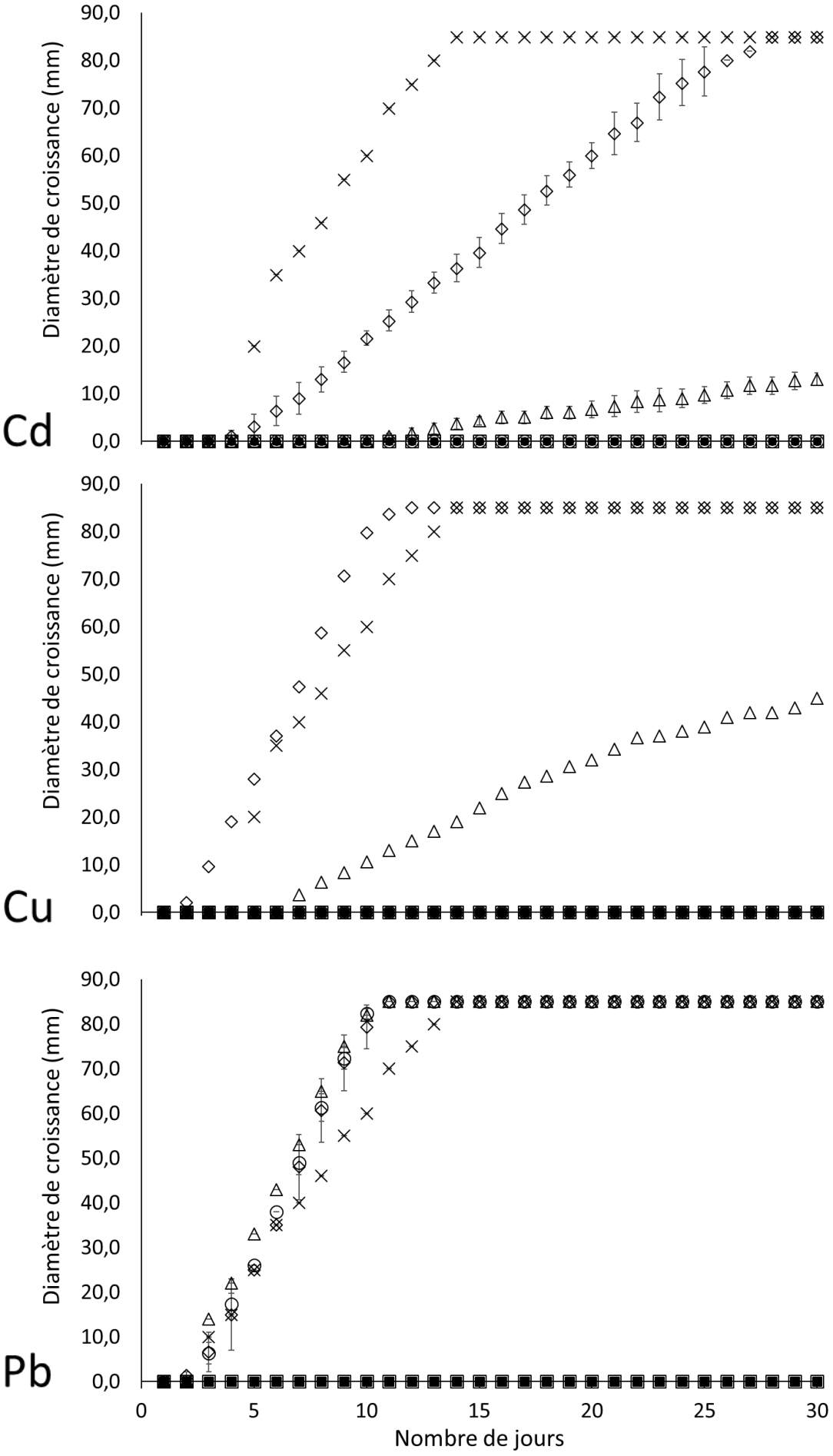


Figure 47 : profil de tolérance de Fomes fomentarius en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

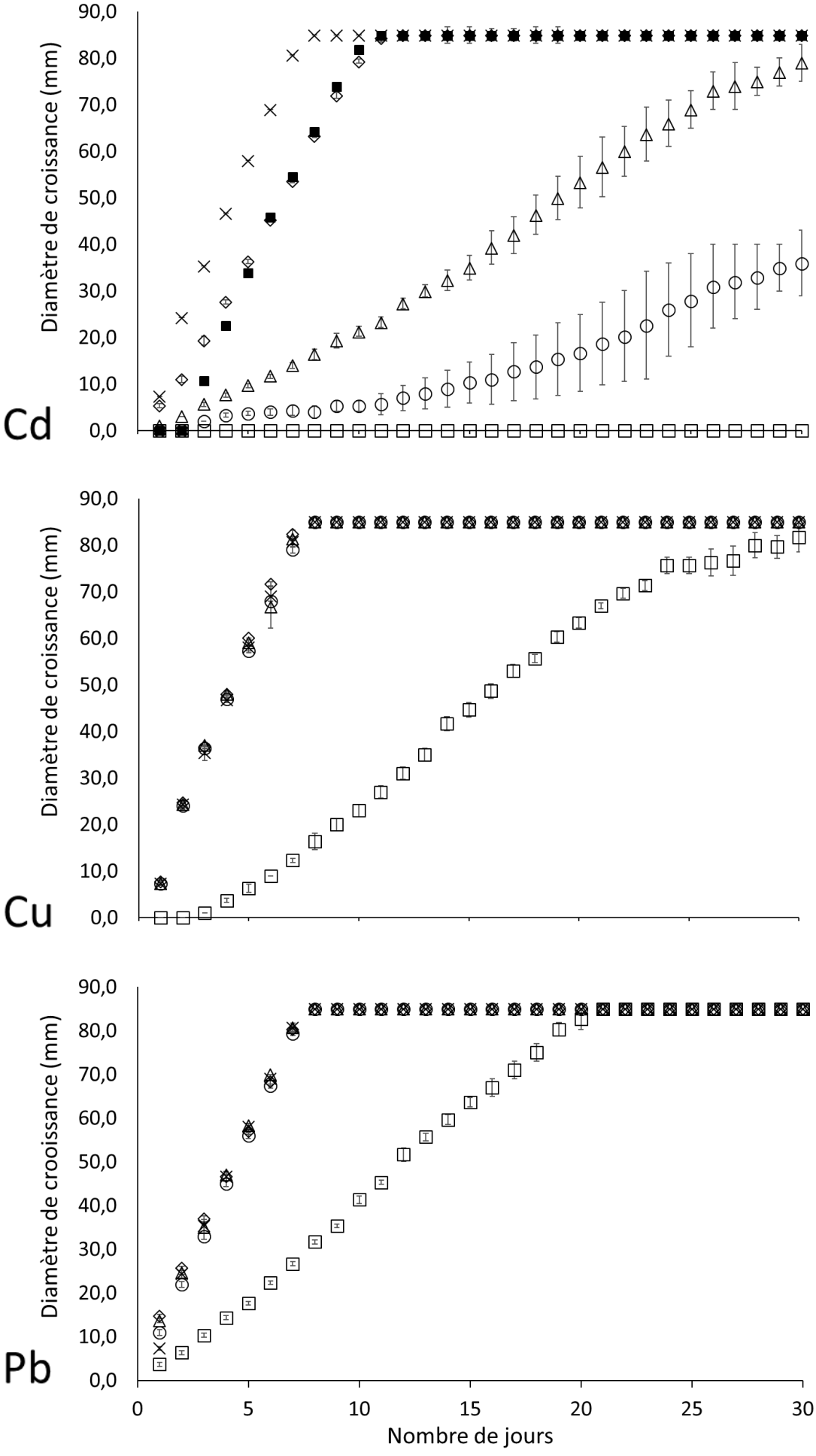


Figure 48 : profil de tolérance de Fusarium oxysporum en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

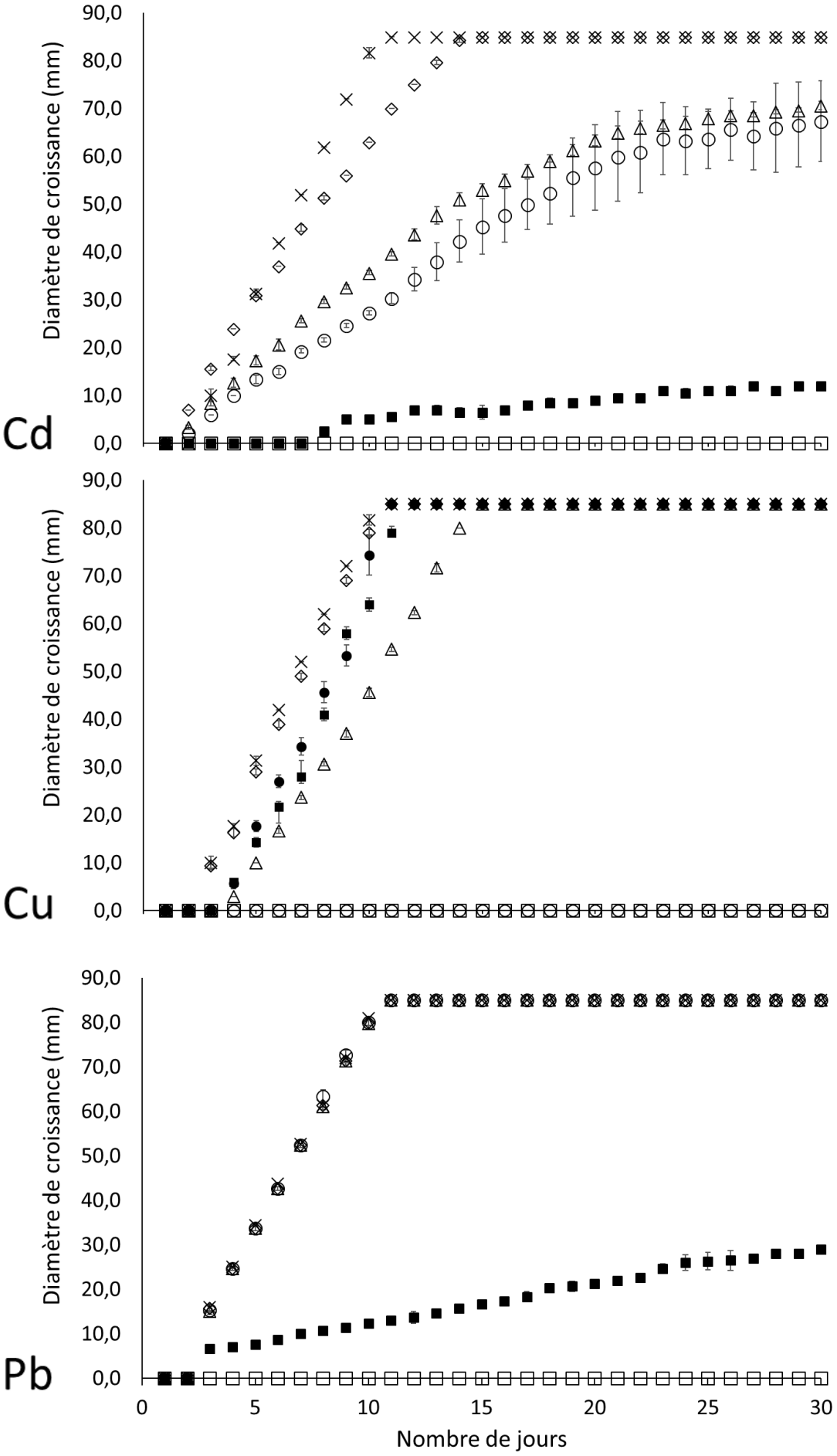


Figure 49 : profil de tolérance de Ganoderma resinaceum en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

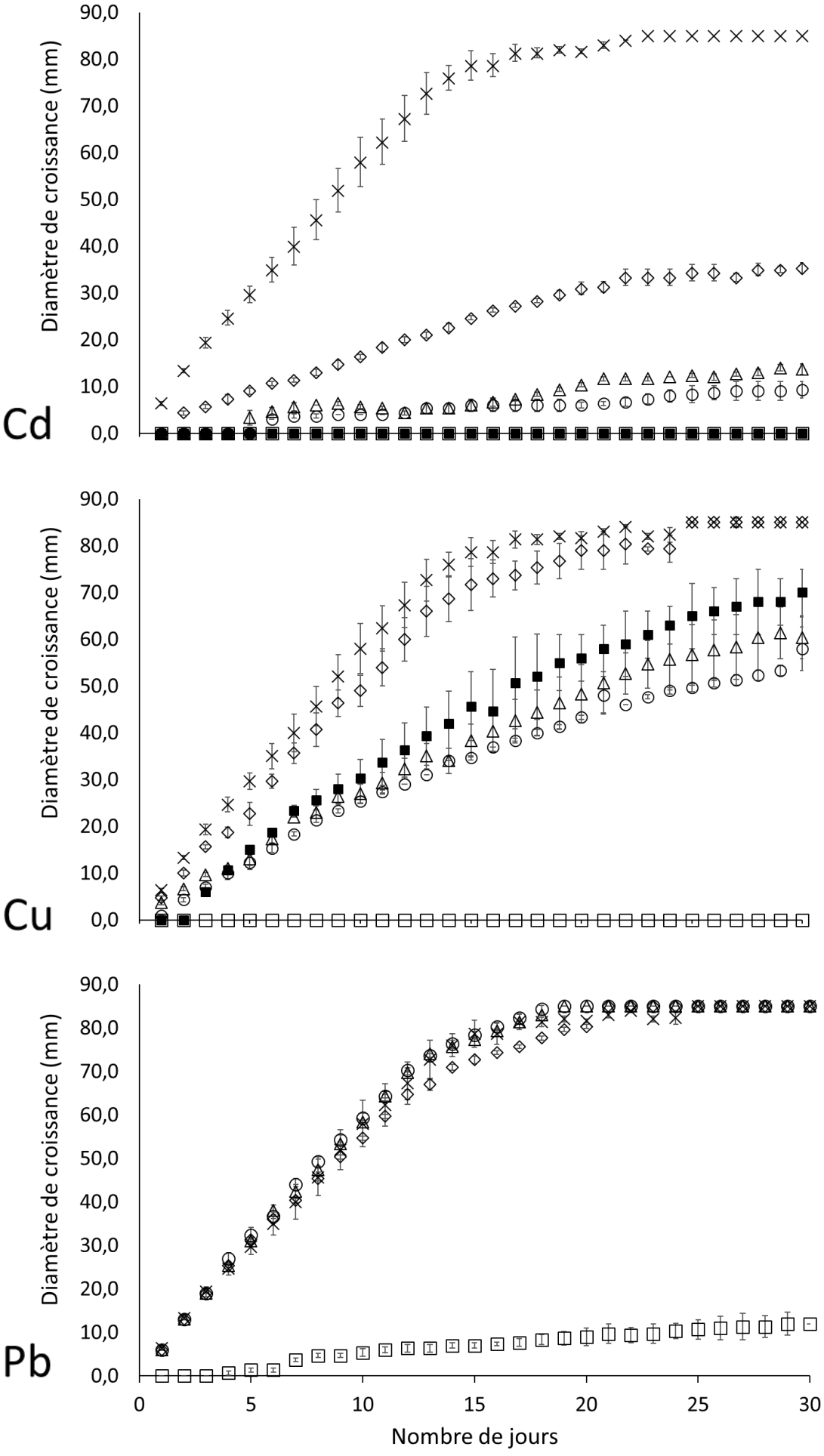


Figure 50 : profil de tolérance de Humicola fuscoatra en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

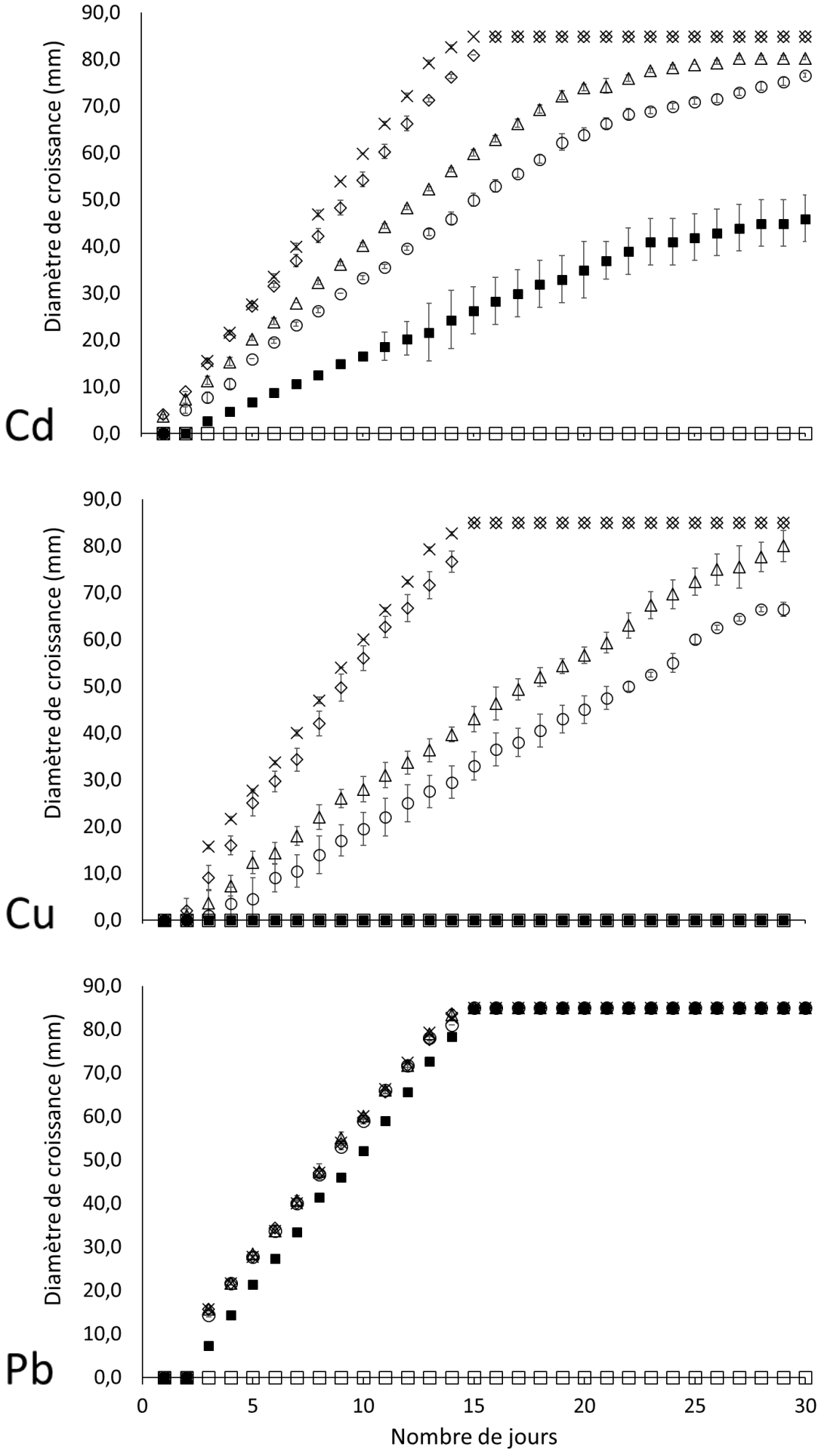


Figure 51 : profil de tolérance de Humicola sp en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

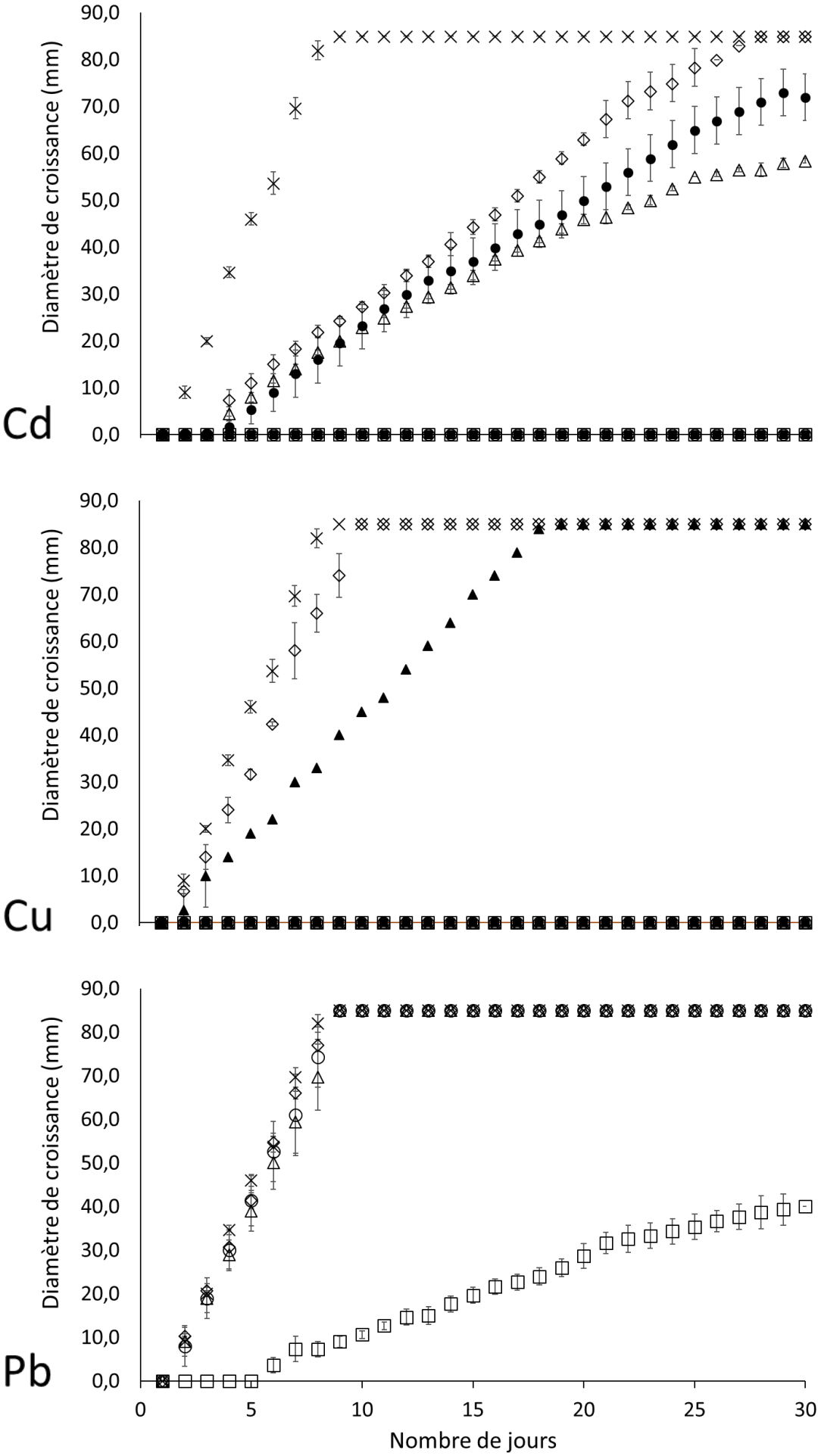


Figure 52 : profil de tolérance de Irpex lacteus en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

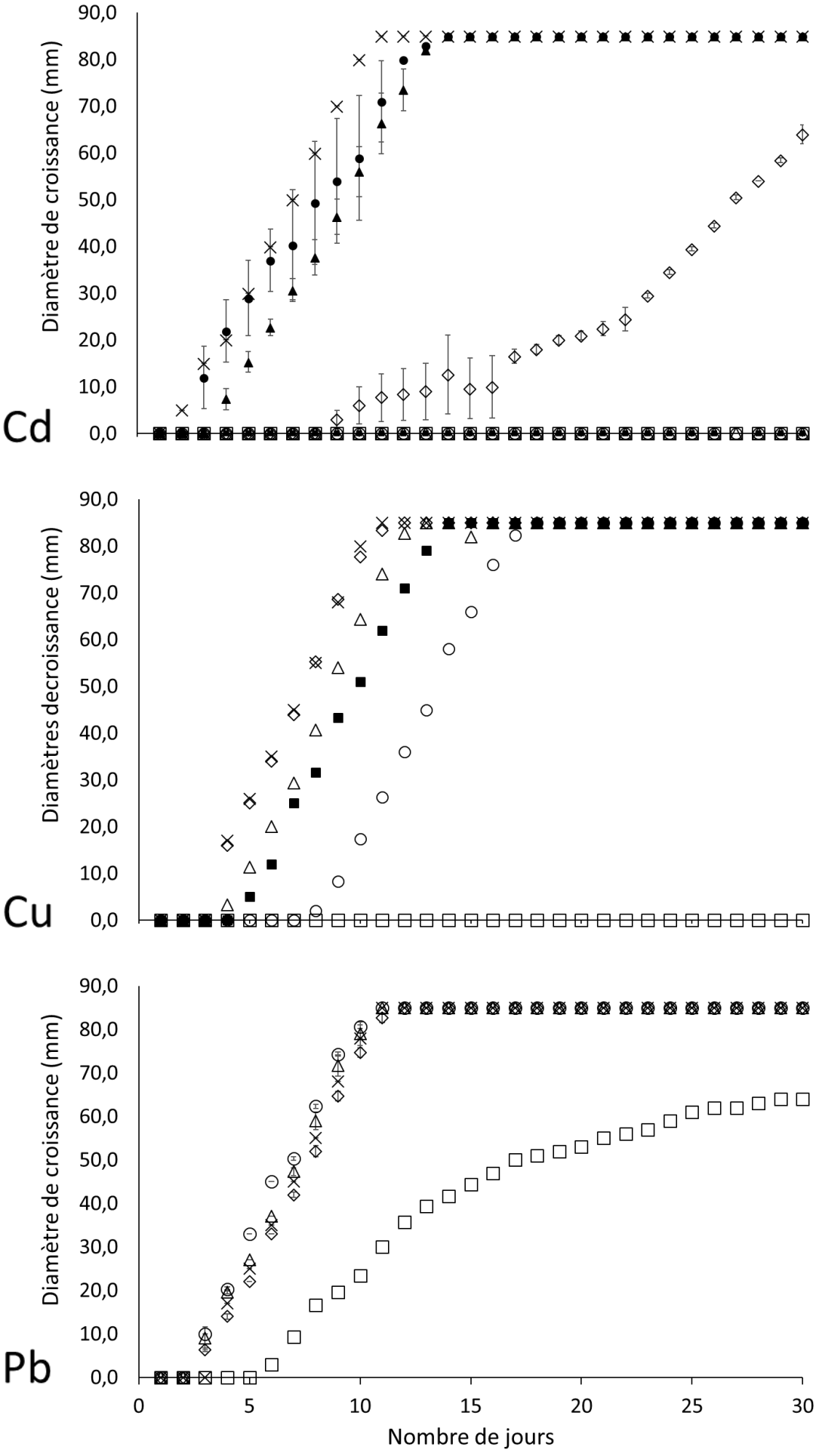


Figure 53 : profil de tolérance de Laetiporus sulphureus en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

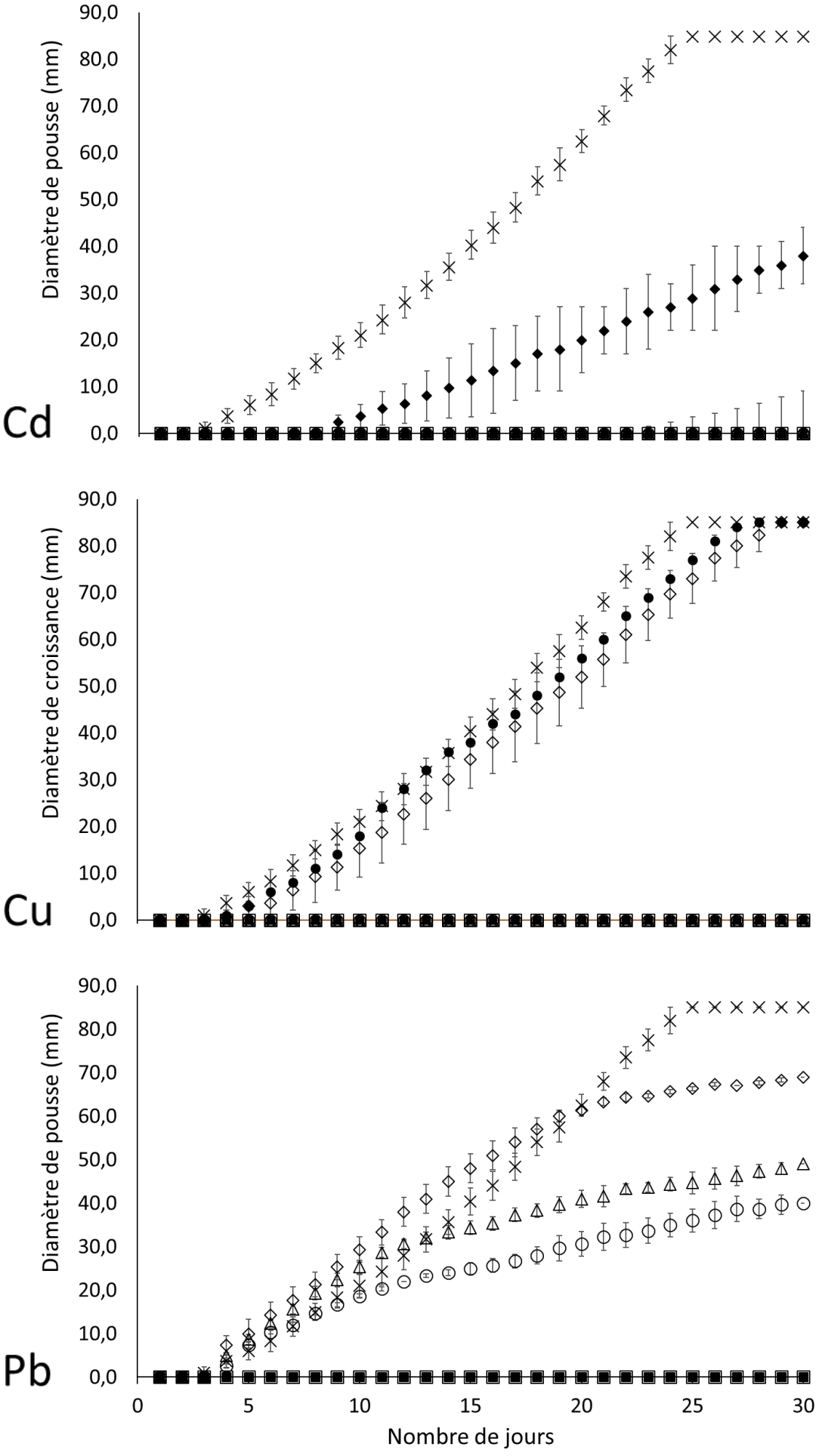


Figure 54 : profil de tolérance de Megacollybia platyphylla en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

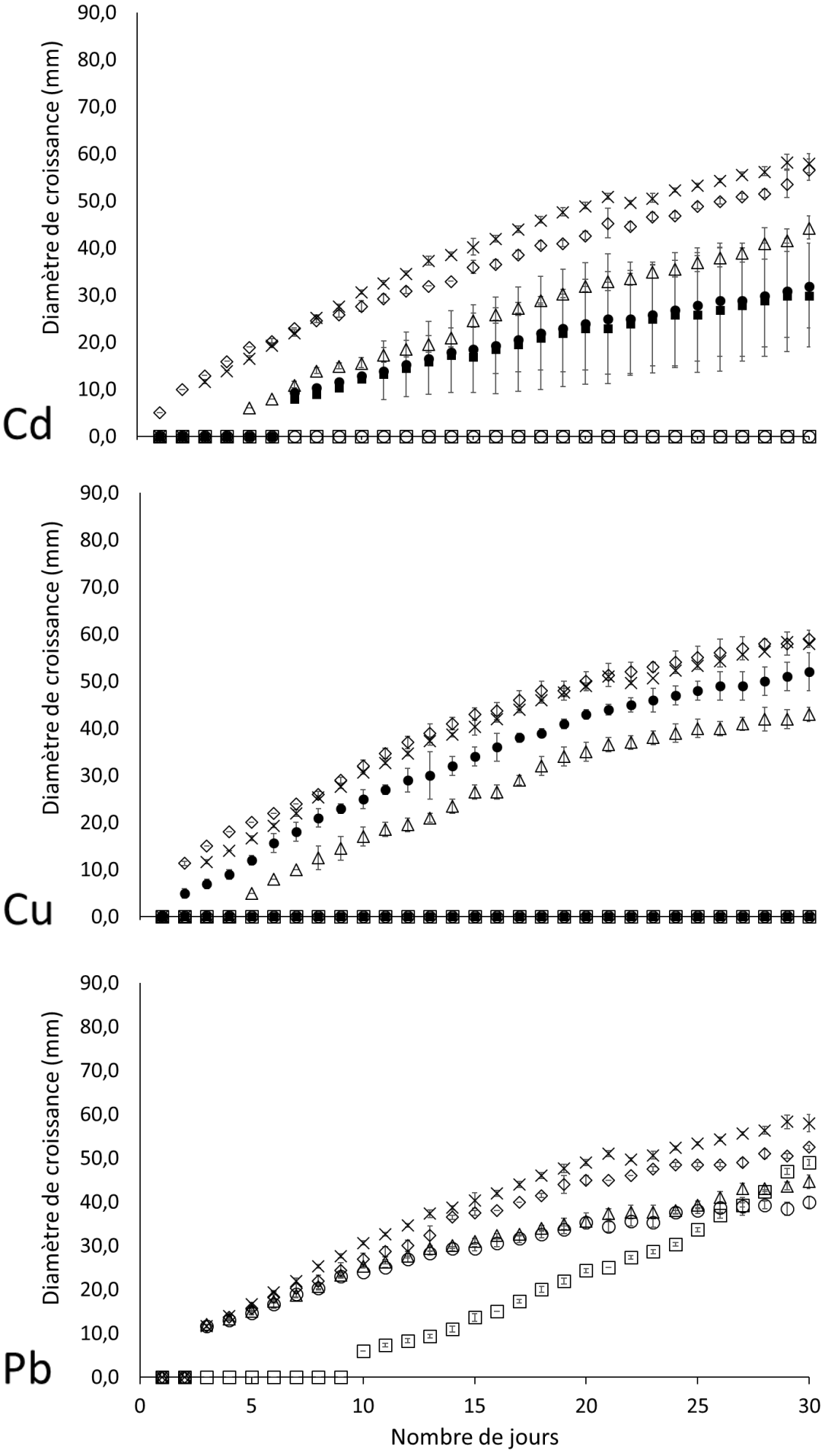


Figure 55 : profil de tolérance de Penicillium oxalicum en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

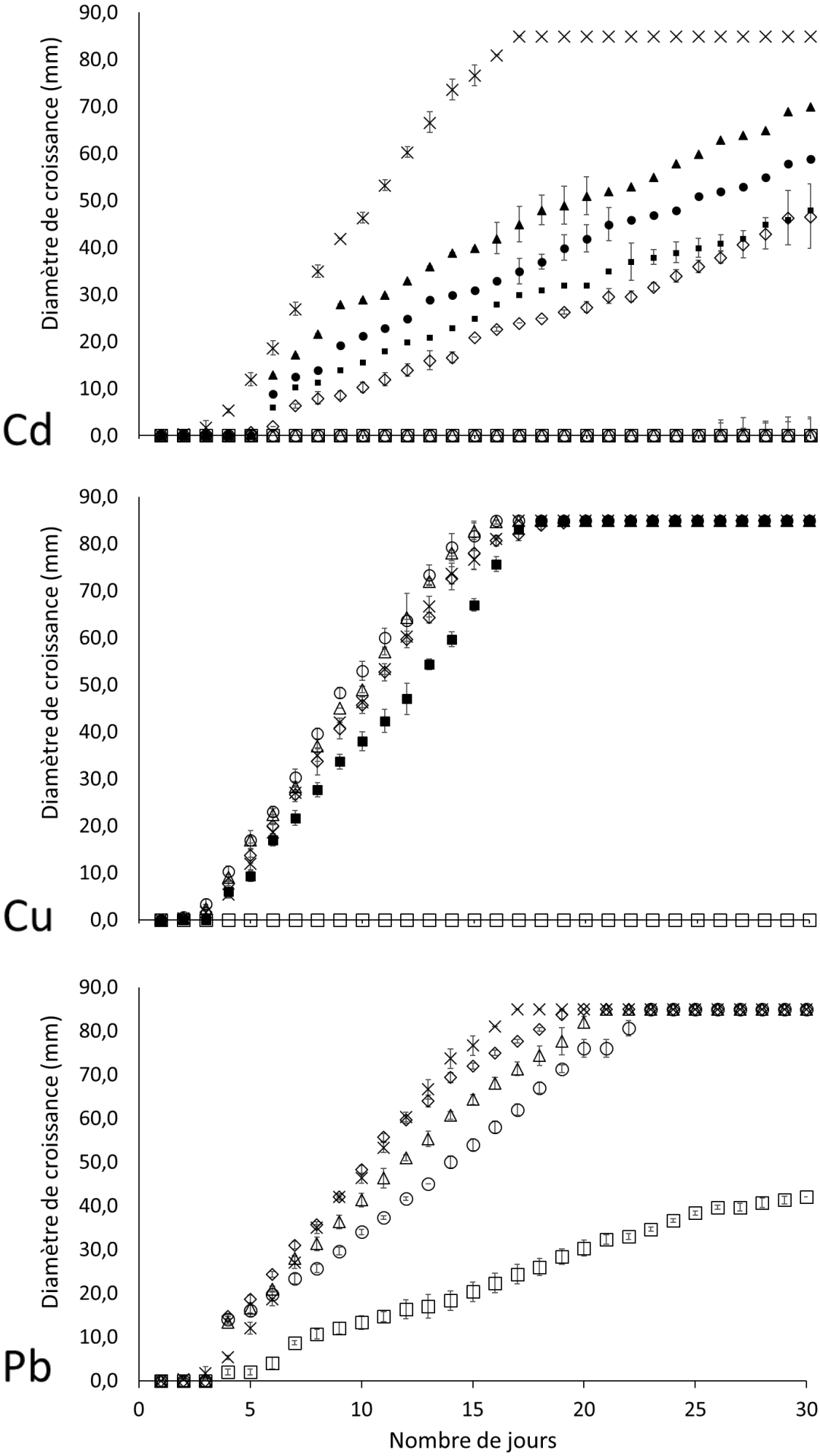


Figure 56 : profil de tolérance de Perenniporia fraxinea en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

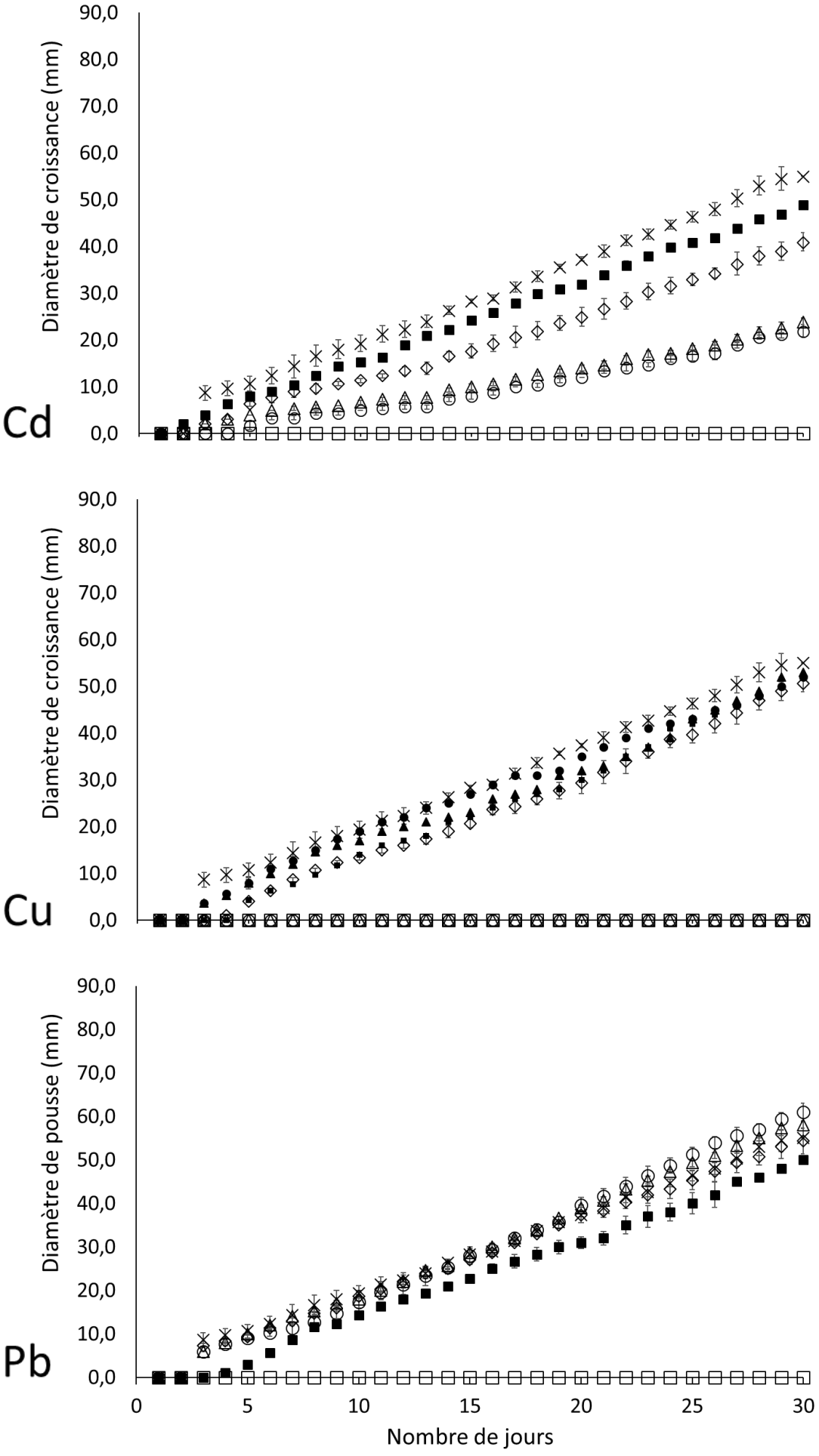


Figure 57 : profil de tolérance de Petriella sp en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

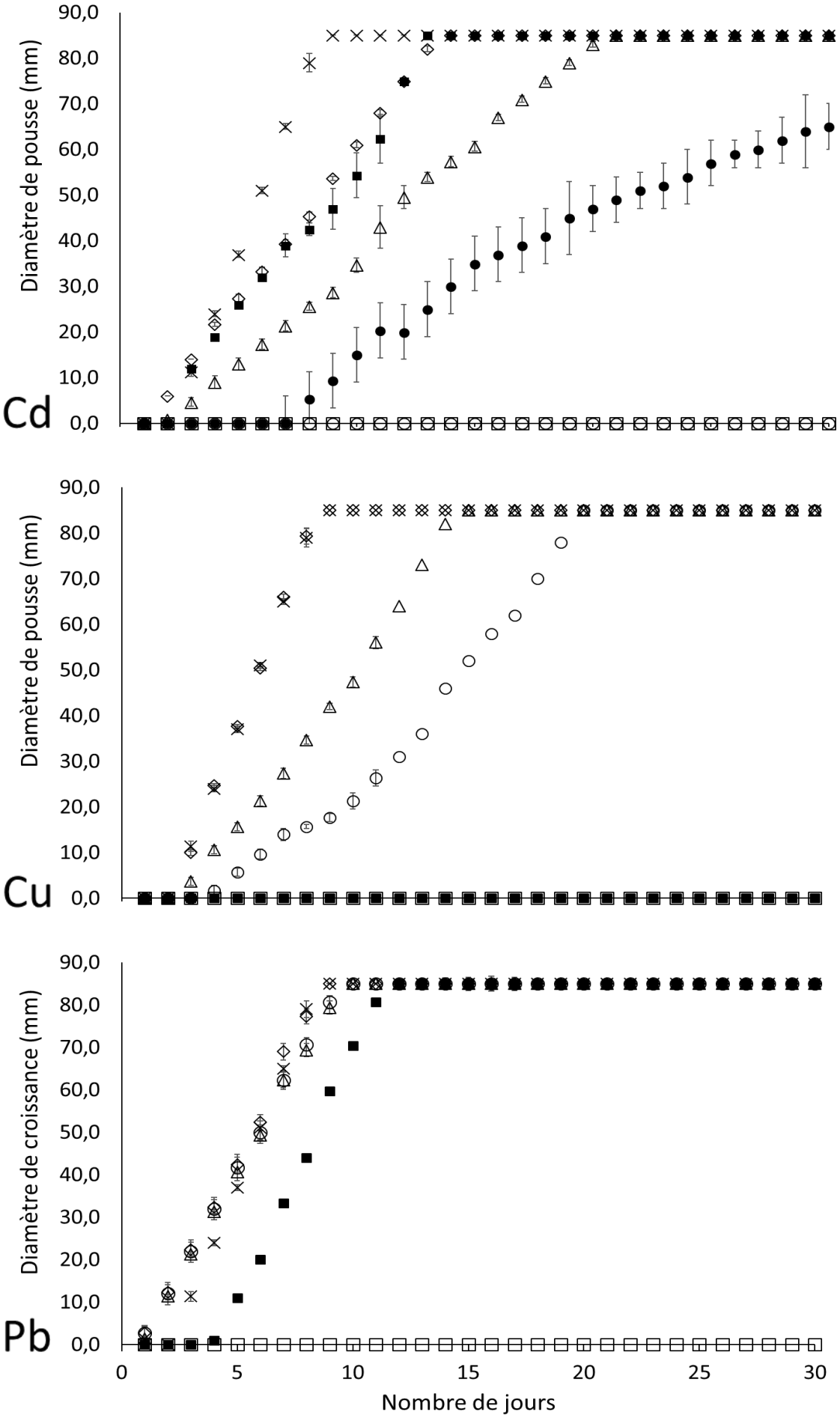


Figure 58 : profil de tolérance de Phaeophlebiopsis peniophoroides en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

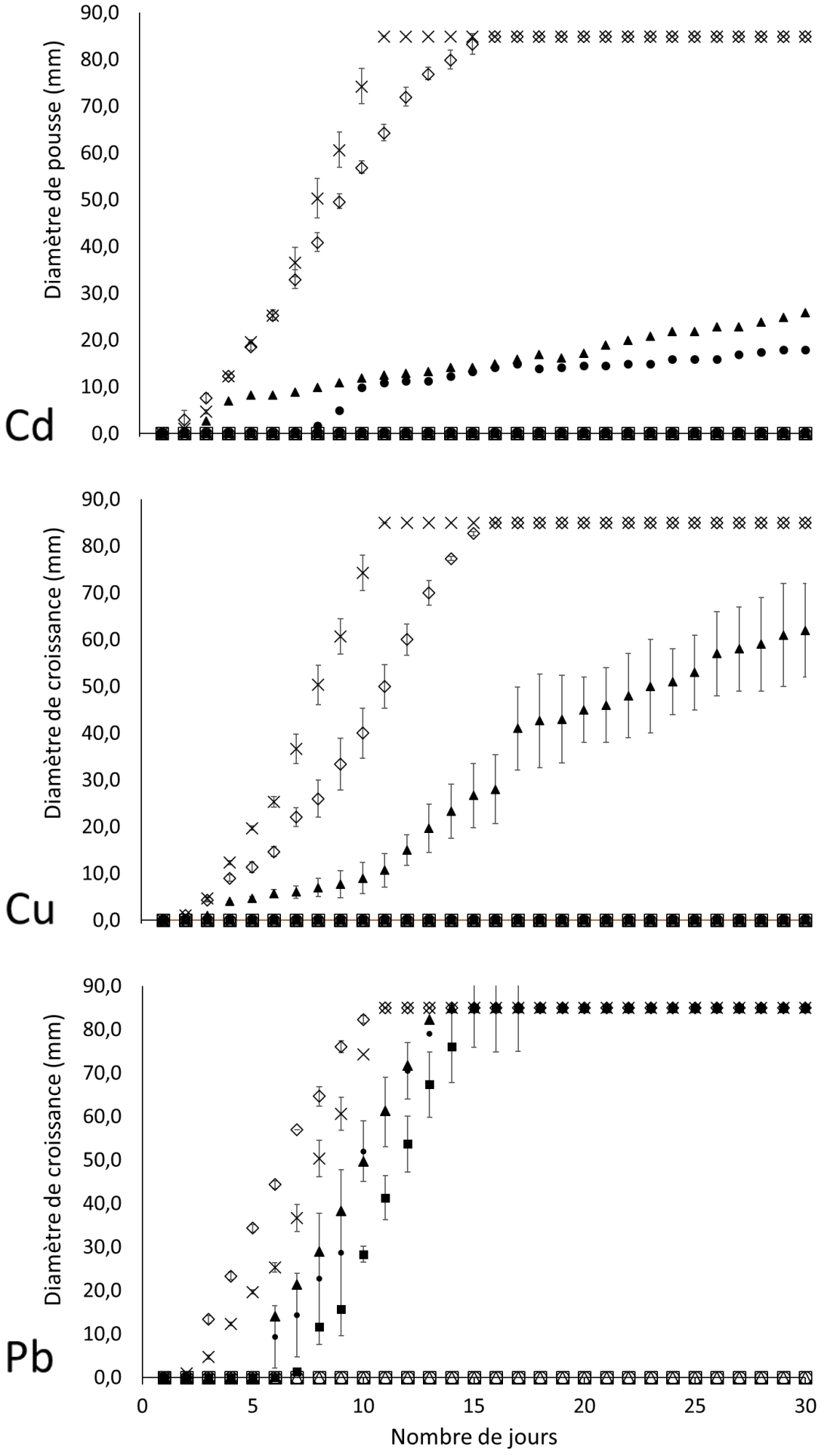


Figure 59 : profil de tolérance de Pleurotus ostreatus en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

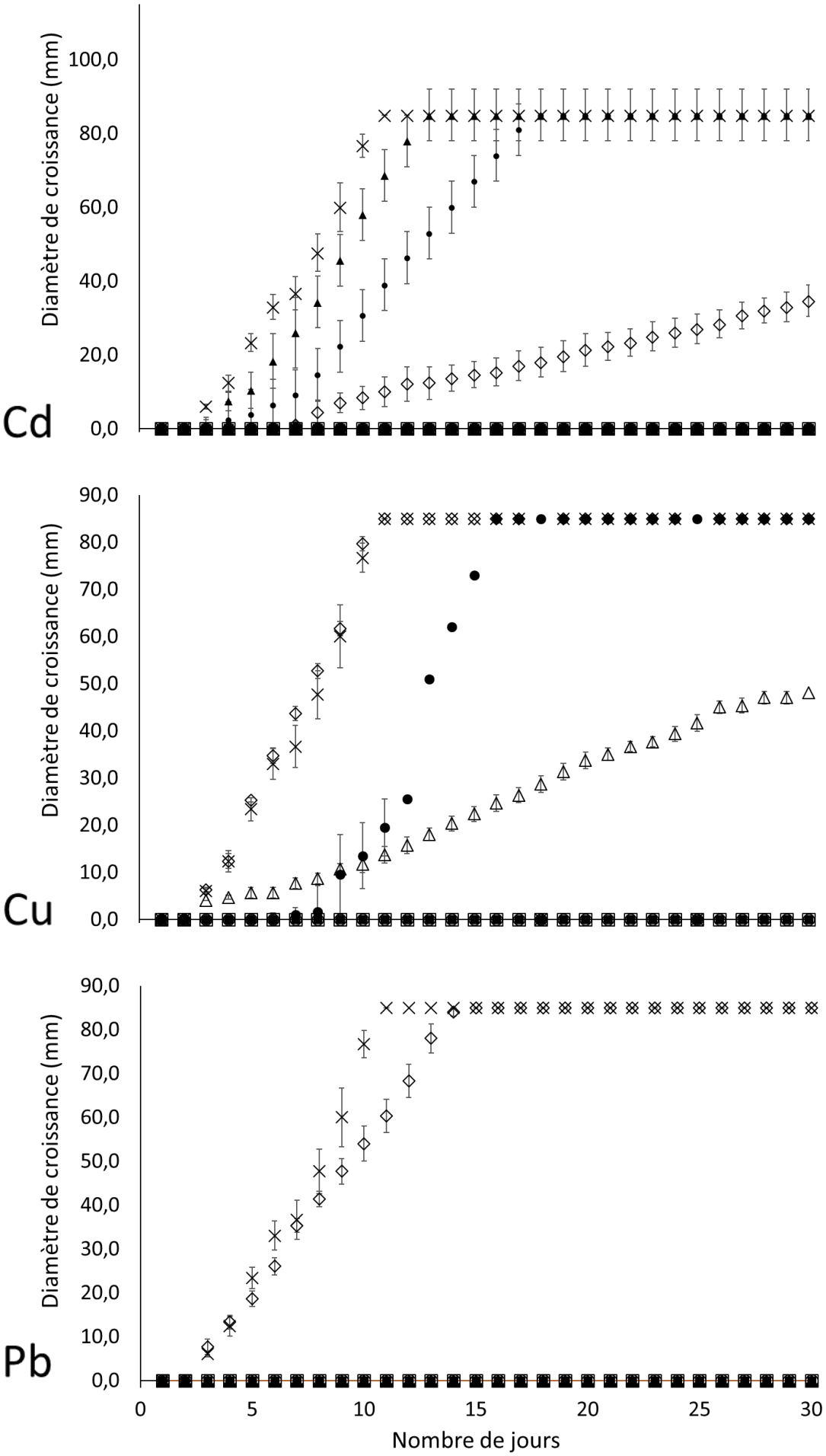


Figure 60 : profil de tolérance de Pleurotus pulmonarius en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

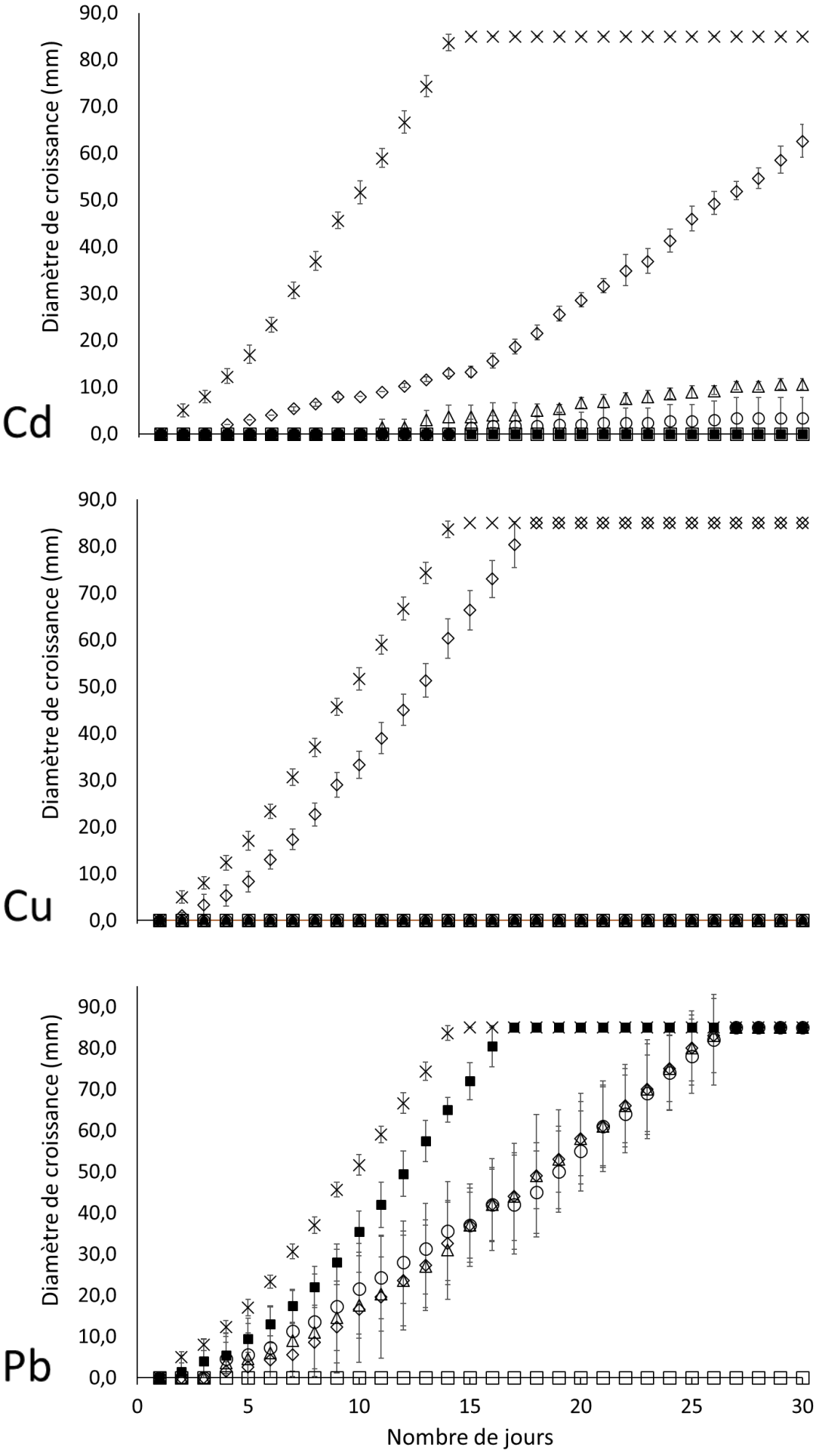


Figure 61 : profil de tolérance de Psathyrella candolleana en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

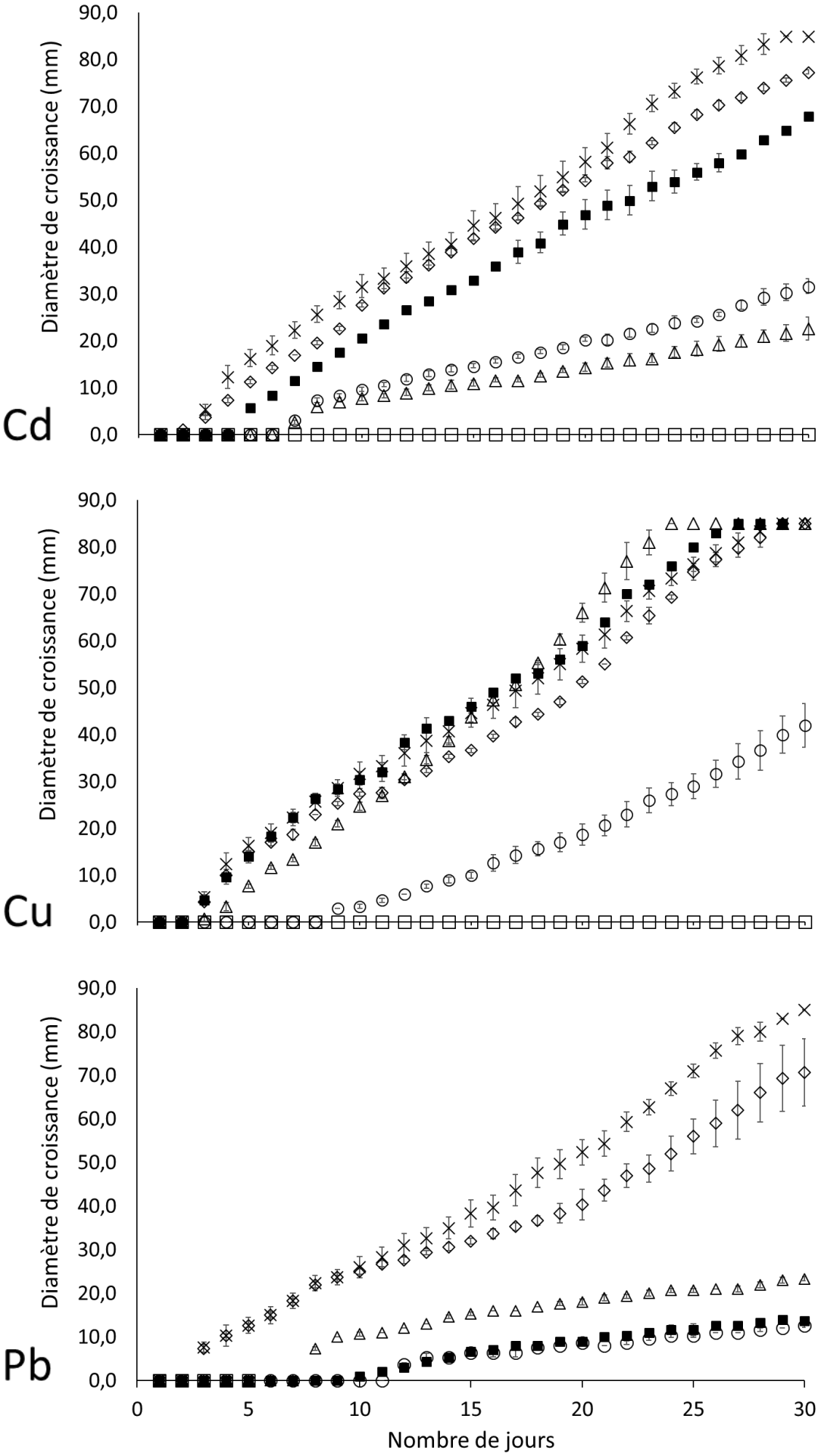


Figure 62 : profil de tolérance de Pseudeurotium bakeri en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

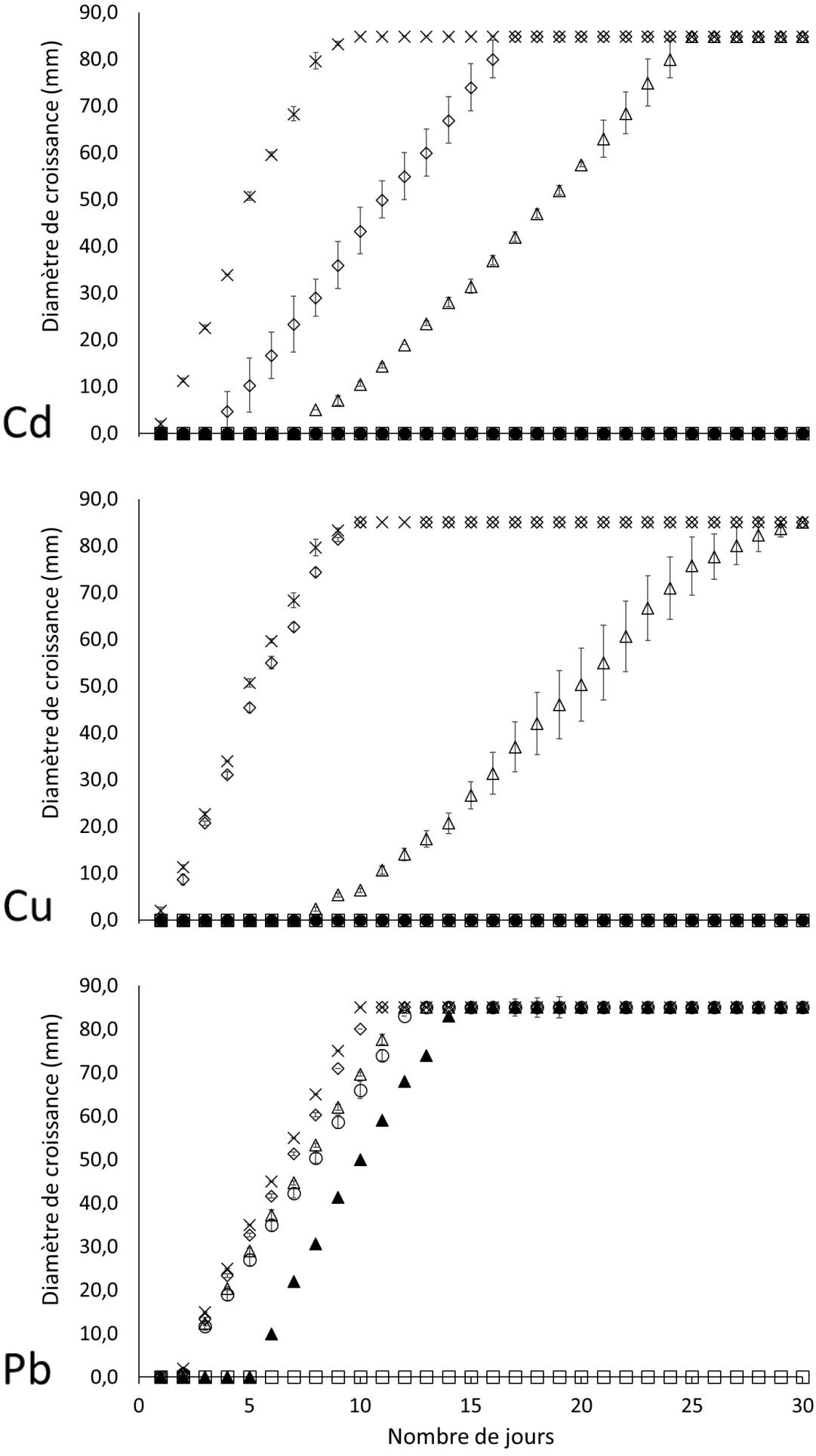


Figure 63 : profil de tolérance de Schizophyllum commune en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

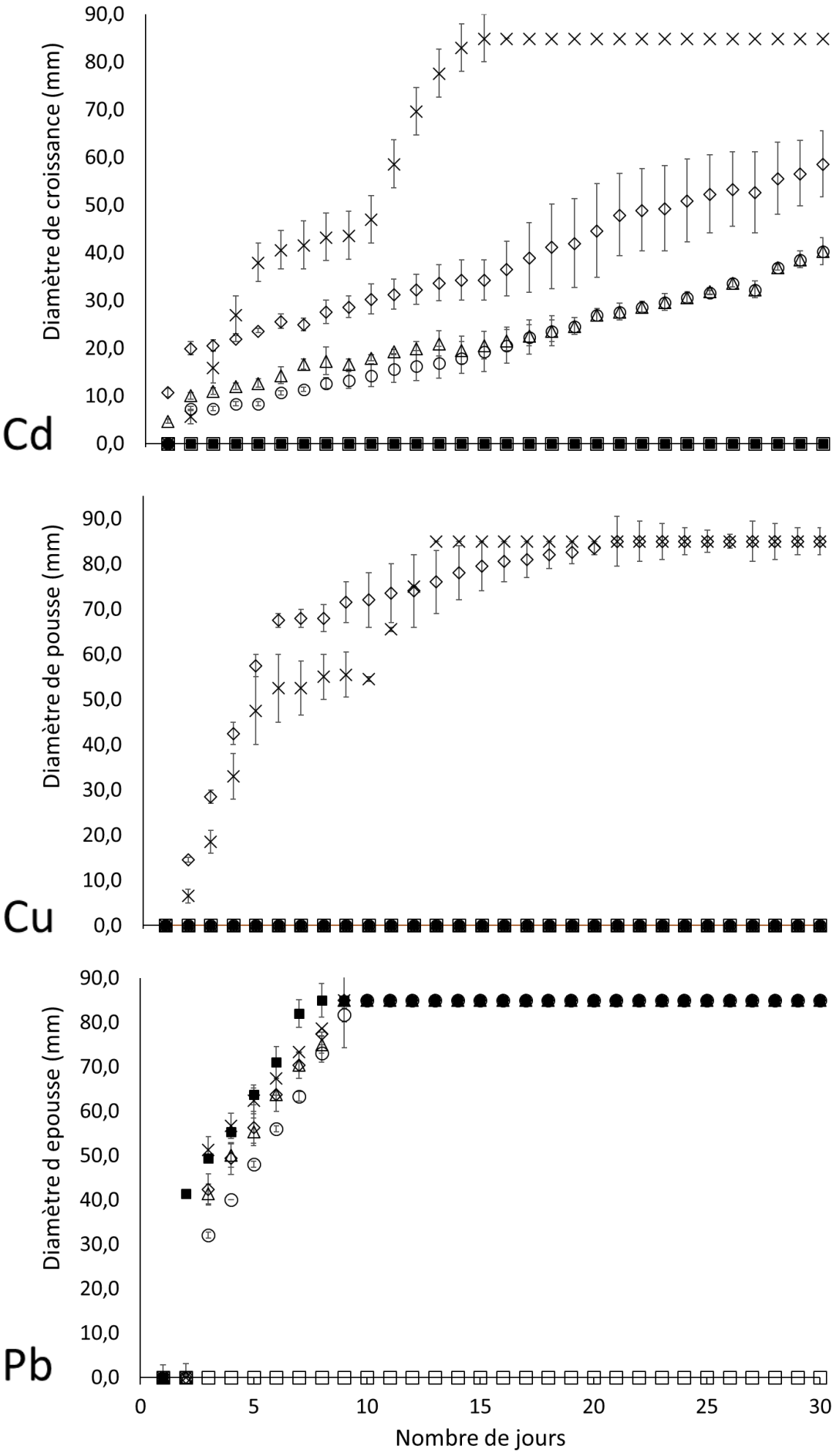


Figure 64 : profil de tolérance de Sordaria lappae en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

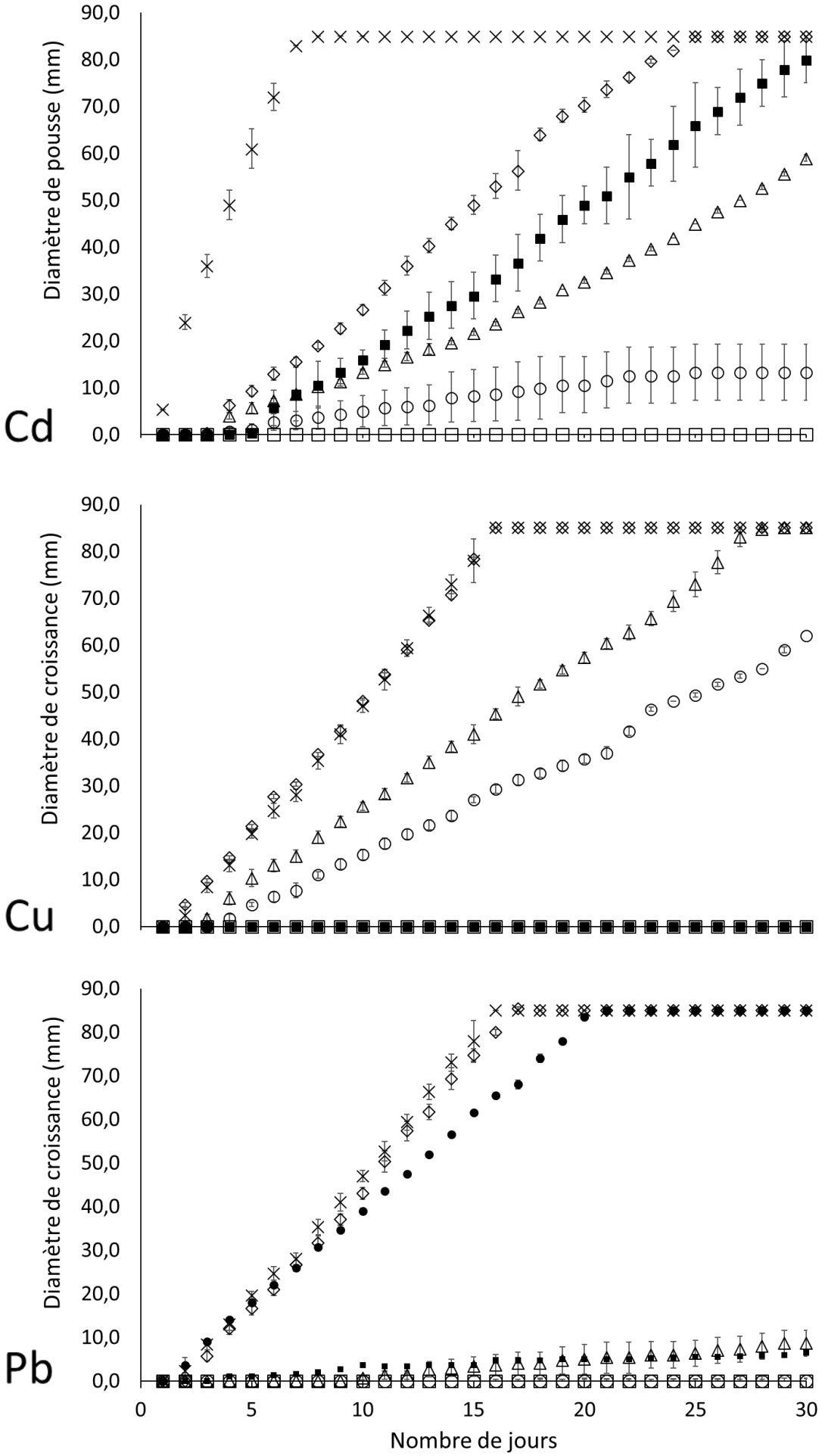


Figure 65 : profil de tolérance de Xylaria sp en milieu gélosé (MEA) exposé à Cd, Cu et Pb.

Annexe V : résultats de l'étude préliminaire avec *Absidia cylindrospora*

Tableau 33 : production de biomasse (en mg) après exposition aux métaux.

Métal	Dose d'exposition ($mg.L^{-1}$)		Biomasse produite (mg)	
			Après 3 jours	Après 7 jours
Cd	**50**	**moy**	**116**	**55**
		EC	2	2
	100	**moy**	**105**	**51**
		EC	9	3
Cu	**50**	**moy**	**87**	**113**
		EC	3	6
	100	**moy**	**83**	**112**
		EC	4	6
Pb	**50**	**moy**	**66**	**69**
		EC	1	3
	100	**moy**	**67**	**69**
		EC	2	2

moy : moyenne
EC : écart-type

Tableau 34 : résultats de biomasse et de biosorption obtenu avec Absidia cylindrospora lors de l'étude préliminaire.

	Cd				Cu				Pb			
	3 jours		7 jours		3jours		7 jours		3 jours		7 jours	
	50 $mg.L^{-1}$	100 $mg.L^{-1}$	50 $mg.L^{-1}$	100 $mg.L^{-1}$	50 $mg.L^{-1}$	100 $mg.L^{-1}$	50 $mg.L^{-1}$	100 $mg.L^{-1}$	50 $mg.L^{-1}$	100 $mg.L^{-1}$	50 $mg.L^{-1}$	100 $mg.L^{-1}$
Biomasse (%)	97,7	87,9	67,6	63,1	98,8	94,3	103,4	102,0	62,3	64,1	63,4	63,3
Adsorption (%)	4,0	4,8	9,2	8,0	7,9	8,1	15,3	4,3	2,7	4,9	0,5	1,1
Absorption (%)	63,7	31,7	9,1	5,1	6,2	5,8	5,2	14,9	56,7	40,1	54,9	33,2
Total biosorbé (%)	67,7	36,6	18,2	13,1	14,1	13,8	20,5	19,2	59,4	45,0	55,4	34,2
Total biosorbé ($\mu g.mg^{-1}$)	6,9	9,0	4,6	7,0	2,0	4,2	2,2	4,3	11,3	16,7	11,3	14,0

Annexe VI : résultats du screening des 28 isolats fongiques

Tableau 35 : masse moyenne de mycélium (mg, masse sèche) produit par les 28 isolats au cours de l'étude de screening.

Condition	Paramètre		Zygomycète	Ascomycètes	Basidiomycètes	Total
Témoin	**masse**	**Moy**	**98,85**	**94,29**	**74,56**	**89,23**
	(mg)	EC	3,06	35,80	41,01	9,78
Cd	**masse**	**Moy**	**90,87**	**58,64**	**50,53**	**66,68**
	(mg)	EC	0,91	24,16	27,07	16,13
Cu	**masse**	**Moy**	**89,53**	**61,80**	**52,05**	**67,79**
	(mg)	EC	4,96	25,82	32,40	14,49
Pb	**masse**	**Moy**	**88,70**	**91,45**	**64,13**	**81,43**
	(mg)	EC	1,46	34,98	34,81	11,53

Moy : moyenne
EC : ecart-type

Tableau 36 : résultats de biosorption après exposition des isoltas fongiques au Cd (50 mg.L^{-})[1] pendant 3 jours à 20°C.

Isolat	Taxonomie		pH initial du milieu de culture (ME)	pH du milieu lors de l'ajout de Cd	pH du milieu après exposition	Biomasse fongique après exposition (%)	Biosorption (µg.mg^{-1})	Biosorption (%)	Absorption (%)	Adsorption (%)
Absidia cylindrospora	Zygomycètes	**moy**	**5,4**	**4,4**	**3,7**	**91,9**	**5,9**	**43,2**	**42,3**	**1,0**
		EC	0,0	0,1	0,4	0,9	0,6	4,8	5,0	0,2
Megacollybia platyphylla	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**3,5**	**3,6**	**63,6**	**3,2**	**26,4**	**13,9**	**12,5**
		EC	0,0	0,0	0,1	6,4	0,4	5,8	2,5	4,0
Pleurotus ostreatus	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,8**	**5,9**	**72,0**	**5,6**	**27,8**	**18,6**	**9,2**
		EC	0,0	0,0	0,1	7,9	0,3	6,5	4,9	1,9
Pleurotus pulmonarius	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,7**	**6,0**	**83,8**	**5,7**	**22,1**	**8,4**	**13,7**
		EC	0,0	0,2	0,3	10,1	0,9	3,6	3,8	4,6
Agaricus bisporus	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,5**	**5,2**	**75,2**	**8,7**	**22,9**	**14,4**	**8,6**
		EC	0,0	0,0	0,0	2,5	0,8	1,5	0,6	2,1
Agaricus arvensis	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,5**	**5,2**	**65,9**	**9,6**	**35,3**	**26,0**	**9,3**
		EC	0,0	0,0	0,0	1,4	0,9	3,4	3,2	0,5
Laetiporus sulfureus	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**3,4**	**2,7**	**98,0**	**3,5**	**7,3**	**4,8**	**2,5**
		EC	0,0	0,4	0,2	13,1	1,5	2,7	2,7	0,1
Fomes fomentarius	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,2**	**5,5**	**64,4**	**3,4**	**11,5**	**9,7**	**1,8**
		EC	0,0	0,2	0,0	1,6	0,3	0,7	1,0	0,3
Chaetomium gracile	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**5,4**	**5,0**	**73,8**	**8,1**	**29,1**	**23,0**	**6,2**
		EC	0,0	0,2	0,0	7,9	0,4	1,9	3,9	2,0
Chaetomium atrobrunneum	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**4,7**	**5,0**	**61,0**	**8,8**	**51,2**	**45,0**	**6,2**
		EC	0,0	0,0	0,1	1,5	0,6	2,2	1,3	0,9
Sordaria lappae	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**6,0**	**5,4**	**47,4**	**6,7**	**33,5**	**22,3**	**11,2**
		EC	0,0	0,0	0,3	1,4	0,3	0,7	1,3	0,6
Petriella sp	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**5,6**	**5,1**	**93,0**	**10,6**	**16,7**	**4,6**	**12,1**
		EC	0,0	0,0	0,2	21,4	1,2	3,6	1,8	2,7
Humicola fuscoatra	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**4,7**	**4,9**	**63,9**	**3,1**	**6,8**	**5,2**	**1,6**
		EC	0,0	0,4	0,2	37,7	0,4	3,3	3,1	0,1
Humicola sp	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**5,5**	**5,1**	**47,0**	**7,5**	**32,9**	**26,1**	**6,8**
		EC	0,0	0,2	0,1	8,6	0,2	5,2	7,8	2,6
Ganoderma resinaceum	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**4,1**	**4,4**	**40,0**	**12,0**	**11,3**	**3,8**	**7,4**
		EC	0,0	0,2	0,1	2,5	1,8	1,1	0,0	1,1

Coprinellus xanthothrix	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**6,3**	**5,9**	**57,4**	**14,2**	**40,6**	**37,1**	**3,5**
		EC	0,0	0,1	0,1	3,4	1,5	2,5	1,7	0,9
Emericellopsis minima	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**6,1**	**6,2**	**80,2**	**5,3**	**49,0**	**44,7**	**4,3**
		EC	0,0	0,1	0,0	7,3	0,4	2,5	2,5	0,8
Penicillium oxalicum	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**2,3**	**2,3**	**64,1**	**0,6**	**4,6**	**0,7**	**3,9**
		EC	0,0	0,0	0,3	31,1	3,7	7,9	1,8	6,2
Pseudeurotium bakeri	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**6,1**	**6,1**	**67,1**	**2,6**	**17,7**	**16,8**	**0,9**
		EC	0,0	0,0	0,0	7,1	0,2	1,0	1,0	0,1
Perenniporia fraxinea	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,1**	**4,6**	**69,8**	**2,5**	**40,6**	**34,2**	**6,4**
		EC	0,0	0,1	0,1	4,9	0,1	1,9	3,0	1,1
Coprinellus micaceus	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,6**	**4,5**	**68,1**	**10,3**	**26,6**	**17,6**	**9,1**
		EC	0,0	0,1	0,0	14,7	0,3	3,7	1,8	2,4
Schizophyllum commune	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**4,6**	**4,3**	**53,8**	**3,9**	**14,0**	**14,0**	**0,0**
		EC	0,0	0,0	0,1	8,6	0,2	5,2	7,8	2,6
Xylaria sp	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**5,1**	**5,3**	**36,2**	**10,6**	**28,7**	**20,1**	**8,6**
		EC	0,0	0,1	0,1	2,0	1,2	3,8	4,3	1,8
Phaeophlebiopsis peniophoroides	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**4,3**	**3,8**	**75,3**	**10,2**	**19,1**	**6,1**	**13,0**
		EC	0,0	0,1	0,1	3,0	1,3	3,3	1,3	2,5
Irpex lacteus	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**4,4**	**4,0**	**62,3**	**5,4**	**13,9**	**6,5**	**7,4**
		EC	0,0	0,0	0,0	10,7	1,2	0,5	1,2	1,5
Psathyrella candolleana	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**4,6**	**5,0**	**94,0**	**10,4**	**19,7**	**14,7**	**5,1**
		EC	0,0	0,1	0,1	13,8	1,0	1,1	1,4	0,6
Fusarium oxysporum	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**5,8**	**5,1**	**48,9**	**7,4**	**12,9**	**5,9**	**7,0**
		EC	0,0	0,2	0,3	20,6	1,8	4,5	2,5	4,2
Coniochaeta hoffmanii	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**6,4**	**5,8**	**87,9**	**4,5**	**25,3**	**18,5**	**6,9**
		EC	0,0	0,0	0,2	5,5	0,1	1,3	1,2	0,1

ME : Malt Extract

Moy : moyenne calculée sur 3 réplicats ; EC : écart-type

Tableau 37 : résultats de biosorption après exposition des isoltas fongiques au Cu (50 mg.L^{-})[1] pendant 3 jours à 20°C.

Isolat	Taxonomie		pH initial du milieu de culture (ME)	pH du milieu lors de l'ajout de Cu	pH du milieu après exposition	Biomasse fongique après d'exposition (%)	Biosorption (µg.mg^{-1})	Biosorption (%)	Absorption (%)	Adsorption (%)
Absidia cylindrospora	Zygomycètes	**moy**	**5,4**	**4,3**	**3,6**	**90,6**	**0,9**	**6,2**	**4,9**	**1,3**
		EC	0,0	0,0	0,1	5,0	0,1	0,7	0,4	0,3
Megacollybia platyphylla	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**3,5**	**3,2**	**103,7**	**2,1**	**27,5**	**13,0**	**14,4**
		EC	0,0	0,0	0,0	18,9	0,2	2,8	3,3	0,7
Pleurotus ostreatus	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,8**	**4,7**	**57,0**	**7,2**	**24,0**	**16,4**	**7,6**
		EC	0,0	0,1	0,0	1,4	0,6	1,4	0,7	2,1
Pleurotus pulmonarius	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**6,0**	**5,3**	**90,1**	**6,8**	**28,1**	**11,7**	**16,4**
		EC	0,0	0,0	0,1	7,5	0,8	1,1	0,4	1,2
Agaricus bisporus	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,5**	**4,4**	**59,2**	**9,3**	**18,2**	**10,7**	**7,5**
		EC	0,0	0,1	0,0	18,4	1,6	3,4	3,4	0,5
Agaricus arvensis	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,5**	**4,6**	**66,6**	**6,3**	**21,4**	**14,8**	**6,6**
		EC	0,0	0,0	0,1	24,0	2,0	5,0	3,4	4,4
Laetiporus sulfureus	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**3,9**	**2,3**	**99,7**	**5,4**	**10,6**	**3,3**	**7,3**
		EC	0,0	0,2	0,1	26,3	2,8	4,3	2,2	2,1
Fomes fomentarius	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,4**	**4,5**	**60,1**	**8,1**	**20,8**	**9,0**	**11,9**
		EC	0,0	0,1	0,2	23,0	2,9	2,8	2,7	0,9
Chaetomium gracile	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**5,1**	**4,5**	**61,1**	**9,5**	**28,7**	**19,9**	**8,8**
		EC	0,0	0,1	0,0	3,6	0,2	1,8	1,0	0,8
Chaetomium atrobrunneum	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**4,5**	**4,0**	**78,6**	**5,6**	**41,6**	**33,7**	**7,9**
		EC	0,0	0,0	0,0	8,2	0,2	3,2	4,4	1,2
Sordaria lappae	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**6,1**	**4,9**	**56,9**	**6,5**	**37,9**	**24,2**	**13,7**
		EC	0,0	0,0	0,0	6,8	1,3	3,7	3,0	1,2
Petriella sp	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**5,6**	**4,4**	**106,3**	**10,8**	**18,1**	**6,0**	**12,2**
		EC	0,0	0,2	0,0	6,4	0,9	2,9	0,3	3,0
Humicola fuscoatra	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**4,7**	**4,2**	**75,7**	**6,8**	**19,5**	**12,8**	**6,7**
		EC	0,0	0,4	0,1	19,1	0,5	4,5	3,2	1,4
Humicola sp	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**5,9**	**4,8**	**43,3**	**7,9**	**32,0**	**24,4**	**7,6**
		EC	0,0	0,1	0,1	1,2	0,3	2,2	2,9	1,7

Ganoderma resinaceum	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**4,2**	**3,4**	**77,9**	**9,7**	**17,8**	**1,7**	**16,1**
		EC	0,0	0,2	0,0	15,5	1,6	4,0	0,5	3,7
Coprinellus xanthothrix	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**6,3**	**4,9**	**49,3**	**7,6**	**19,6**	**16,1**	**3,4**
		EC	0,0	0,0	0,0	2,8	4,4	11,4	10,6	1,7
Emericellopsis minima	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**6,3**	**5,2**	**64,3**	**4,4**	**32,5**	**23,6**	**9,0**
		EC	0,0	0,0	0,0	5,9	0,4	2,9	2,4	1,4
Penicillium oxalicum	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**2,3**	**2,2**	**90,6**	**1,9**	**19,2**	**9,0**	**10,2**
		EC	0,0	0,0	0,1	15,7	2,0	2,8	2,1	4,9
Pseudeurotium bakeri	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**6,1**	**5,0**	**51,6**	**6,3**	**33,1**	**24,5**	**8,6**
		EC	0,0	0,1	0,1	3,9	0,4	2,7	2,3	0,4
Perenniporia fraxinea	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,0**	**4,6**	**63,2**	**2,4**	**35,1**	**26,2**	**8,9**
		EC	0,0	0,0	0,1	3,6	0,4	4,8	2,5	2,3
Coprinellus micaceus	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,7**	**4,7**	**48,0**	**10,8**	**18,3**	**12,4**	**5,8**
		EC	0,0	0,0	0,0	9,1	0,7	2,9	1,2	1,7
Schizophyllum commune	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**4,6**	**4,2**	**52,0**	**6,7**	**23,6**	**15,7**	**7,9**
		EC	0,0	0,0	0,1	1,2	0,3	2,2	2,9	1,7
Xylaria sp	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**5,2**	**4,7**	**32,7**	**10,8**	**26,3**	**11,5**	**14,8**
		EC	0,0	0,5	0,1	0,8	0,9	1,6	2,7	1,8
Phaeophlebiopsis peniophoroides	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**4,4**	**3,7**	**70,0**	**13,2**	**22,7**	**4,7**	**18,0**
		EC	0,0	0,1	0,1	5,5	1,3	0,4	1,2	1,3
Irpex lacteus	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**4,2**	**4,0**	**76,8**	**5,6**	**17,3**	**8,1**	**9,2**
		EC	0,0	0,0	0,0	25,3	2,0	4,7	3,5	1,2
Psathyrella candolleana	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**4,8**	**4,4**	**64,9**	**10,1**	**13,0**	**7,8**	**5,1**
		EC	0,0	0,1	0,0	8,1	2,5	1,4	0,7	0,7
Fusarium oxysporum	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**5,8**	**4,8**	**82,0**	**5,7**	**18,5**	**6,7**	**11,9**
		EC	0,0	0,2	0,1	5,6	0,2	1,9	1,0	1,6
Coniochaeta hoffmanii	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**6,2**	**4,9**	**89,2**	**3,9**	**22,1**	**15,4**	**6,7**
		EC	0,0	0,1	0,1	9,5	0,1	2,0	0,8	1,2

ME : Malt Extract

moy : moyenne calculée sur 3 réplicats ; EC : écart-type

Tableau 38 : résultats de biosorption après exposition des isoltas fongiques au Pb (50 mg.L^{-})[1] pendant 3 jours à 20°C.

Isolat	Taxonomie		pH initial du milieu de culture (ME)	pH du milieu lors de l'ajout de Pb	pH du milieu après exposition	Biomasse fongique après 3 jours d'exposition (%)	Biosorption (µg.mg^{-1})	Biosorption (%)	Absorption (%)	Adsorption (%)
Absidia cylindrospora	Zygomycètes	**moy**	**5,4**	**4,5**	**3,9**	**89,7**	**9,3**	**65,6**	**65,0**	**0,6**
		EC	0,0	0,2	0,2	1,5	0,4	2,2	2,5	0,3
Megacollybia platyphylla	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**3,5**	**3,6**	**73,1**	**8,0**	**72,1**	**68,3**	**3,8**
		EC	0,0	0,0	0,1	11,0	1,2	1,6	2,2	0,9
Pleurotus ostreatus	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,8**	**5,6**	**82,3**	**13,9**	**65,4**	**62,9**	**2,5**
		EC	0,0	0,1	0,2	7,7	2,3	5,0	5,6	0,7
Pleurotus pulmonarius	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,9**	**5,0**	**104,8**	**4,1**	**20,6**	**18,4**	**2,2**
		EC	0,0	0,2	0,0	27,0	0,4	7,3	7,0	0,4
Agaricus bisporus	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,5**	**5,0**	**74,5**	**12,7**	**33,4**	**31,9**	**1,5**
		EC	0,0	0,0	0,0	1,3	0,8	2,4	2,2	1,0
Agaricus arvensis	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,4**	**5,2**	**74,2**	**9,3**	**38,8**	**36,9**	**1,9**
		EC	0,0	0,0	0,0	7,1	1,2	8,3	8,3	0,5
Laetiporus sulfureus	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**3,6**	**2,3**	**112,0**	**29,2**	**76,5**	**74,2**	**2,4**
		EC	0,0	0,3	0,0	5,6	0,4	2,9	3,4	0,7
Fomes fomentarius	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,5**	**5,6**	**70,0**	**20,3**	**73,6**	**71,5**	**2,1**
		EC	0,0	0,1	0,0	4,9	2,5	8,0	8,3	0,7
Chaetomium gracile	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**5,1**	**4,5**	**93,3**	**18,1**	**77,9**	**77,4**	**0,6**
		EC	0,0	0,1	0,0	16,2	5,5	9,7	9,8	0,2
Chaetomium atrobrunneum	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**4,6**	**4,3**	**97,8**	**7,3**	**68,3**	**66,2**	**2,1**
		EC	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3	2,4	2,3	0,1
Sordaria lappae	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**6,0**	**5,6**	**95,1**	**3,7**	**35,2**	**30,3**	**4,9**
		EC	0,0	0,1	0,0	17,8	0,9	0,5	1,5	1,2
Petriella sp	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**5,6**	**5,4**	**116,3**	**18,1**	**6,3**	**5,8**	**0,5**
		EC	0,0	0,1	0,3	13,0	7,5	0,8	0,9	0,2
Humicola fuscoatra	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**5,5**	**5,7**	**126,5**	**16,3**	**78,7**	**77,6**	**1,2**
		EC	0,0	0,0	0,3	7,0	1,4	10,5	10,7	0,3
Humicola sp	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**5,5**	**5,7**	**99,2**	**8,7**	**79,0**	**77,4**	**1,7**
		EC	0,0	0,2	0,2	16,3	1,0	5,5	6,0	0,9
	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**3,9**	**3,3**	**70,4**	**37,5**	**61,9**	**58,8**	**3,1**

Ganoderma resinaceum		**EC**	0,0	0,2	0,2	6,8	4,2	1,3	1,5	0,2
Coprinellus xanthothrix	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**6,3**	**6,2**	**69,7**	**6,0**	**20,7**	**19,3**	**1,4**
		EC	0,0	0,0	0,0	1,7	3,7	12,8	12,9	0,2
Emericellopsis minima	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**6,4**	**6,4**	**102,0**	**2,4**	**33,1**	**30,3**	**2,8**
		EC	0,0	0,0	0,1	4,8	0,5	3,0	2,4	0,9
Penicillium oxalicum	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**2,3**	**2,4**	**87,2**	**9,1**	**88,7**	**87,3**	**1,4**
		EC	0,0	0,0	0,1	7,1	2,6	36,1	35,8	0,3
Pseudeurotium bakeri	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**6,0**	**6,1**	**92,7**	**4,2**	**39,1**	**37,8**	**1,3**
		EC	0,0	0,0	0,0	6,7	0,6	3,3	3,3	0,1
Perenniporia fraxinea	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,1**	**4,6**	**87,4**	**2,3**	**45,9**	**43,9**	**2,0**
		EC	0,0	0,1	0,1	1,1	0,2	4,9	4,7	0,3
Coprinellus micaceus	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**5,6**	**6,1**	**103,5**	**28,0**	**101,2**	**100,9**	**0,2**
		EC	0,0	0,1	0,2	11,4	3,1	0,8	0,8	0,0
Schizophyllum commune	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**4,6**	**4,5**	**100,2**	**10,8**	**72,9**	**72,3**	**0,6**
		EC	0,0	0,0	0,2	16,3	1,0	5,5	6,0	0,9
Xylaria sp	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**5,1**	**5,1**	**91,5**	**13,3**	**90,1**	**89,9**	**0,2**
		EC	0,0	0,3	0,0	6,2	1,1	4,3	4,3	0,1
Phaeophlebiopsis peniophoroides	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**4,6**	**4,0**	**65,7**	**44,3**	**72,3**	**70,0**	**2,4**
		EC	0,0	0,1	0,0	3,5	2,4	5,6	5,9	0,3
Irpex lacteus	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**4,4**	**4,1**	**120,8**	**3,7**	**20,6**	**19,5**	**1,2**
		EC	0,0	0,0	0,0	25,3	1,1	8,1	8,3	0,4
Psathyrella candolleana	Basidiomycètes	**moy**	**5,4**	**4,8**	**5,0**	**114,6**	**44,5**	**104,0**	**104,0**	**0,0**
		EC	0,0	0,1	0,2	7,3	2,9	6,8	6,8	0,0
Fusarium oxysporum	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**5,7**	**5,1**	**43,3**	**6,9**	**11,5**	**9,1**	**2,4**
		EC	0,0	0,2	0,1	6,1	1,1	0,4	0,1	0,6
Coniochaeta hoffmanii	Ascomycètes	**moy**	**5,4**	**6,3**	**5,8**	**130,7**	**6,4**	**52,4**	**51,7**	**0,6**
		EC	0,0	0,1	0,4	4,9	1,8	12,8	12,8	0,4

ME : Malt Extract

moy : moyenne calculée sur 3 réplicats; EC : écart-type

Annexe VII : photographies des microcosmes de sols

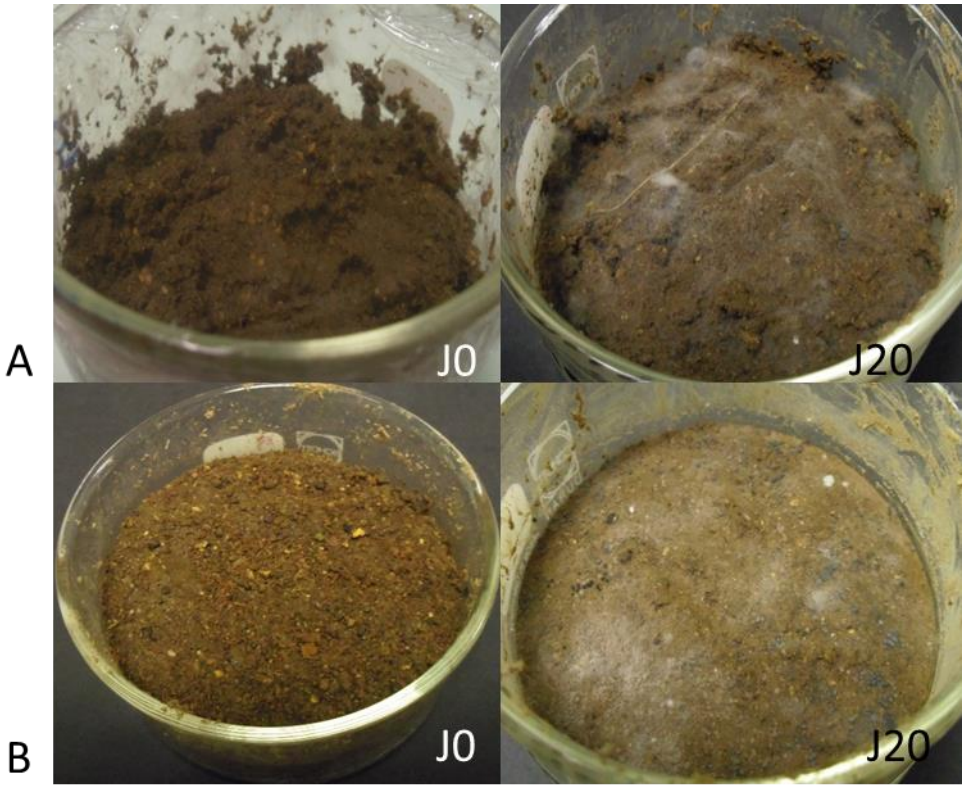


Figure 66 : photographies des microcosmes à J0 et J20 montrant le développement fongique après bioaugmentation avec C. atrobrunneum (A) et bioaugmentation C. micaceus (B).

Annexe VIII : évaluation de l'apport des minéraux aux microcosmes de sol

Tableau 39 : apport en éléments minéraux dû au milieu de culture apporté au microcosme.

Élément	Apport milieu de culture ($mg.l^{-1}$)	Quantité apportée microcosme (µg)	Teneur initiale sol ($mg.g^{-1}$)	Masse totale au sein du microcosme (mg)	Apport (%(m/m))
Fe	0,20	3,0	50,2	3012	**0,0001**
K	2000,00	30,0	1,9	114	**0,027**
Ca	2,10	31,5	122,6	7356	**0,0004**
Mn	0,40	6,0	3,9	528	**0,001**
Zn	0,40	6,0	0,12	7,2	**0,08**
K	0,10	1,5	1,8	108	**0,001**
Cu	0,04	0,6	0,025	1,5	**0,0004**

Annexe IX : résultats des spéciations minéralogiques au sein des microcosmes de sol

Tableau 40 : répartition (%) de Cd au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme.

Fractions		Microcosme témoin	Microcosme biostimulé	Microcosme bioaugmenté avec *A. cylindrospora*	Microcosme bioaugmenté avec *C. atrobrunneum*	Microcosme bioaugmenté avec *C. micaceus*
F1 eau		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	moy	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
	EC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
F2 échangeable		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	moy	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
	EC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
F3 acido-soluble		1,6	1,7	1,7	1,8	1,7
		1,4	2,3	2,0	2,0	2,0
		1,6	1,7	2,0	3,1	1,8
		1,7	-	2,3	2,4	2,6
	moy	**1,6**	**1,9**	**2,0**	**2,3**	**2,1**
	EC	0,1	0,3	0,2	0,4	0,3
F4 réductible		28,2	25,4	21,5	20,1	20,7
		27,0	28,4	22,0	26,9	27,8
		27,8	23,3	23,9	25,3	27,8
		26,6	-	23,3	19,8	25,7
	moy	**27,4**	**25,7**	**22,7**	**26,1**	**25,5**
	EC	0,6	1,8	0,9	0,8	0,9
F5 oxydable		1,1	1,3	1,5	1,1	1,2
		1,2	0,5	1,9	0,8	2,6
		1,2	0,6	1,6	2,7	2,7
		1,0	-	2,8	-	1,5
	moy	**1,1**	**0,8**	**2,0**	**0,9**	**2,0**
	EC	0,1	0,3	0,4	0,1	0,5
F6 total potentiellement disponible		30,9	28,5	24,7	23,0	23,6
		29,7	31,2	26,0	29,7	32,4
		30,6	25,6	27,5	31,0	32,4
		29,4	-	28,5	-	29,8
	moy	**30,2**	**28,4**	**26,7**	**29,3**	**29,5**
	EC	0,6	1,9	1,3	3,9	1,1

moy : moyenne, EC : écart-type

- : valeur non retenue (aberrante ou volatilisation de l'échantillon)

Tableau 41 : répartition (%) de Cu au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme.

Fractions		Microcosme témoin	Microcosme biostimulé	Microcosme bioaugmenté avec *A. cylindrospora*	Microcosme bioaugmenté avec *C. atrobrunneum*	Microcosme bioaugmenté avec *C. micaceus*
F1 eau		0,4	0,1	0,1	0,3	0,2
		0,4	0,2	0,1	0,4	1,4
		0,4	0,1	0,2	0,4	0,1
		1,6	0,6	0,3	0,3	0,1
	moy	**0,7**	**0,2**	**0,2**	**0,4**	**0,5**
	EC	0,5	0,2	0,1	0,0	0,5
F2 échangeable		0,4	0,2	0,3	0,3	0,3
		0,7	0,5	0,3	0,5	1,2
		0,5	0,2	0,3	0,3	0,3
		0,9	1,3	0,3	0,8	0,3
	moy	**0,6**	**0,6**	**0,3**	**0,5**	**0,5**
	EC	0,2	0,1	0,0	0,2	0,3
F3 acido-soluble		0,3	0,1	0,2	0,4	0,4
		1,4	0,1	0,1	0,7	1,0
		0,6	0,1	0,2	0,1	0,3
		0,4	-	0,3	0,2	0,2
	moy	**0,7**	**0,1**	**0,2**	**0,4**	**0,5**
	EC	0,4	0,0	0,1	0,2	0,3
F4 réductible		25,1	25,7	20,0	32,2	31,3
		32,9	28,2	22,1	31,0	35,7
		25,8	25,4	16,4	25,3	30,3
		37,4	-	21,8	-	35,9
	moy	**30,3**	**26,4**	**20,1**	**29,4**	**33,3**
	EC	4,8	1,2	1,9	4,7	2,5
F5 oxydable		4,7	6,0	8,7	6,6	4,3
		5,6	7,0	11,8	6,6	6,7
		4,1	6,5	9,6	16,1	6,1
		5,2	-	8,7	-	4,6
	moy	**4,9**	**10,70**	**9,7**	**9,8**	**5,4**
	EC	0,5	5,6	1,0	4,4	1,0
F6 total potentiellement disponible		31,0	32,1	29,2	39,8	36,5
		41,1	36,1	34,3	39,2	46,0
		31,3	45,3	26,8	42,2	37,2
		45,5	-	31,4	-	41,1
	moy	**37,2**	**37,8**	**30,4**	**40,5**	**40,2**
	EC	6,1	5,0	2,5	7,5	3,3

moy : moyenne, EC : écart-type

- : valeur non retenue (aberrante ou volatilisation de l'échantillon)

Tableau 42 : répartition (%) de Pb au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme.

Fractions		Microcosme témoin	Microcosme biostimulé	Microcosme bioaugmenté avec *A. cylindrospora*	Microcosme bioaugmenté avec *C. atrobrunneum*	Microcosme bioaugmenté avec *C. micaceus*
F1 eau		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	moy	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
	EC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
F2 échangeable		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
	moy	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
	EC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
F3 acido-soluble		0,5	0,3	1,9	1,1	1,1
		0,5	0,5	1,0	1,5	0,7
		0,4	0,5	1,1	1,0	1,0
		0,6	-	1,2	1,5	1,1
	moy	**0,5**	**0,3**	**1,3**	**1,3**	**0,8**
	EC	0,1	0,2	0,3	0,3	0,5
F4 réductible		2,5	2,0	2,8	3,9	3,2
		2,5	3,5	2,2	5,5	3,4
		3,2	3,6	2,3	6,0	3,9
		2,9	-	4,4	-	3,1
	moy	**2,8**	**3,0**	**2,9**	**5,1**	**3,3**
	EC	0,3	0,7	0,7	1,4	1,6
F5 oxydable		3,1	0,5	3,6	1,2	2,0
		2,3	1,1	8,7	2,6	0,7
		-	1,9	2,3	10,5	2,5
		2,3	-	8,2	-	4,3
	moy	**2,1**	**1,2**	**5,7**	**4,8**	**1,4**
	EC	0,7	0,6	2,7	0,5	0,8
F6 total potentiellement disponible		6,1	2,7	8,3	6,3	6,3
		5,3	5,2	11,9	9,7	5,0
		4,2	6,0	5,6	17,5	7,3
		5,9	-	13,8	-	8,6
	moy	**5,4**	**4,6**	**9,9**	**11,2**	**6,8**
	EC	0,6	1,3	1	4,2	1,1

moy : moyenne, EC : écart-type

- : valeur non retenue (aberrante ou volatilisation de l'échantillon)

Tableau 43 : répartition (%) de Ca au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme.

Fractions		Microcosme témoin	Microcosme biostimulé	Microcosme bioaugmenté avec *A. cylindrospora*	Microcosme bioaugmenté avec *C. atrobrunneum*	Microcosme bioaugmenté avec *C. micaceus*
F1 eau		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	moy	**0,1**	**0,1**	**0,1**	**0,1**	**0,1**
	EC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
F2 échangeable		1,0	1,0	1,1	1,3	1,4
		1,0	0,9	1,1	1,3	1,4
		1,1	0,9	0,9	1,3	1,4
		1,1	1,2	0,9	1,5	1,5
	moy	**1,1**	**1,0**	**1,0**	**1,3**	**1,4**
	EC	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
F3 acido-soluble		15,1	15,3	14,9	23,5	23,5
		14,5	15,5	15,6	24,5	26,1
		14,8	16,2	14,4	23,3	25,3
		15,8	-	13,3	23,9	24,0
	moy	**15,0**	**15,7**	**14,5**	**23,8**	**24,7**
	EC	0,4	5,9	0,7	0,4	1,0
F4 réductible		1,3	1,2	1,7	2,4	2,0
		1,4	1,5	1,7	2,0	2,5
		0,1	1,2	1,4	3,0	1,7
		0,1	-	0,3	2,3	3,0
	moy	**0,7**	**1,3**	**1,2**	**2,5**	**2,3**
	EC	0,6	0,5	0,5	0,3	0,5
F5 oxydable		1,1	1,4	4,8	3,4	1,9
		1,2	0,5	4,3	3,3	4,6
		1,2	1,1	4,8	2,7	2,5
		1,1	-	4,9		3,1
	moy	**0,9**	**1,0**	**4,7**	**3,2**	**3,0**
	EC	0,4	0,5	0,2	1,2	0,8
F6 total potentiellement disponible		18,7	19,1	22,6	30,7	28,8
		17,0	18,6	22,8	31,5	34,7
		17,2	19,5	21,6	30,4	30,9
		19,4	-	19,4	-	31,8
	moy	**17,8**	**19,1**	**21,6**	**30,9**	**31,6**
	EC	0,7	0,3	1,7	1,2	1,7

moy : moyenne, EC : écart-type

- : valeur non retenue (aberrante ou volatilisation de l'échantillon)

Tableau 44 : répartition (%) de Cr au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme.

Fractions		Microcosme témoin	Microcosme biostimulé	Microcosme bioaugmenté avec *A. cylindrospora*	Microcosme bioaugmenté avec *C. atrobrunneum*	Microcosme bioaugmenté avec *C. micaceus*
F1 eau		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	moy	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
	EC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
F2 échangeable		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,1	0,0	0,1	0,0
	moy	**0,0**	**0,1**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
	EC	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
F3 acido-soluble		0,6	0,4	1,0	0,7	1,0
		0,5	0,5	1,0	0,8	1,4
		0,8	0,6	1,0	1,4	1,2
		0,6	-	0,9	0,8	1,5
	moy	**0,6**	**0,5**	**1,0**	**0,9**	**1,3**
	EC	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
F4 réductible		25,3	21,3	24,5	25,7	27,7
		24,3	21,1	21,4	29,0	46,0
		27,3	21,9	27,8	24,7	32,5
		22,6	-	21,2	-	34,0
	moy	**24,9**	**21,4**	**23,7**	**26,5**	**35,1**
	EC	1,4	0,3	2,4	4,0	5,5
F5 oxydable		4,6	7,3	11,4	13,7	14,7
		3,1	6,8	13,7	10,3	5,9
		2,5	5,6	10,9	11,8	10,3
		6,4	-	8,7	-	11,7
	moy	**4,2**	**6,6**	**11,2**	**11,9**	**10,7**
	EC	1,3	0,6	1,4	4,5	2,6
F6 total potentiellement disponible		30,5	29,0	36,9	40,1	43,5
		28,0	28,5	36,1	40,1	53,4
		30,7	28,1	39,7	37,8	44,1
		29,6	-	30,8	-	47,3
	moy	**29,7**	**28,5**	**35,9**	**39,4**	**47,1**
	EC	0,9	0,3	2,7	8,5	3,3

moy : moyenne, EC : écart-type

- : valeur non retenue (aberrante ou volatilisation de l'échantillon)

Tableau 45 : répartition (%) de Fe au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme.

Fractions		Microcosme témoin	Microcosme biostimulé	Microcosme bioaugmenté avec *A. cylindrospora*	Microcosme bioaugmenté avec *C. atrobrunneum*	Microcosme bioaugmenté avec *C. micaceus*
F1 eau		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	moy	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
	EC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
F2 échangeable		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
	moy	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
	EC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
F3 acido-soluble		0,8	1,1	1,0	1,1	1,0
		0,7	1,4	1,2	1,3	1,3
		1,1	0,8	1,2	2,2	1,2
		1,0	-	1,4	1,6	1,9
	moy	**0,9**	**1,1**	**1,2**	**1,5**	**1,3**
	EC	0,1	0,4	0,1	0,4	0,3
F4 réductible		35,4	32,1	29,2	44,0	40,1
		30,8	36,8	29,6	55,5	55,7
		34,2	29,5	31,6	51,0	54,6
		31,9	-	32,8	-	50,9
	moy	**33,1**	**32,8**	**30,8**	**50,16**	**50,3**
	EC	1,7	2,7	1,4	6,7	5,1
F5 oxydable		1,4	1,9	1,5	1,5	1,7
		0,8	0,4	1,4	1,1	4,4
		1,5	0,7	1,8	4,5	4,7
		1,2	-	2,4	-	1,9
	moy	**1,2**	**1,0**	**1,8**	**2,4**	**3,2**
	EC	0,2	0,6	0,3	1,4	1,4
F6 total potentiellement disponible		37,6	35,1	31,7	46,6	42,8
		32,4	38,7	32,2	57,9	61,5
		36,8	31,0	34,7	57,8	60,5
		34,1	-	36,6	-	54,8
	moy	**35,2**	**34,9**	**33,8**	**54,1**	**54,9**
	EC	2,0	2,6	2,2	8,0	6,1

moy : moyenne, EC : écart-type

- : valeur non retenue (aberrante ou volatilisation de l'échantillon)

Tableau 46 : répartition (%) de K au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme.

Fractions		Microcosme témoin	Microcosme biostimulé	Microcosme bioaugmenté avec *A. cylindrospora*	Microcosme bioaugmenté avec *C. atrobrunneum*	Microcosme bioaugmenté avec *C. micaceus*
F1 eau		0,9	2,2	1,7	1,9	3,1
		0,7	2,2	2,2	1,8	3,1
		0,5	1,9	1,9	1,5	3,1
		0,9	2,2	1,8	1,9	3,4
	moy	**0,8**	**2,1**	**1,9**	**1,8**	**3,2**
	EC	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
F2 échangeable		4,3	7,1	7,0	3,2	3,3
		3,9	6,4	7,0	3,2	3,0
		3,7	6,6	5,6	3,1	3,1
		4,6	7,5	6,0	3,6	3,3
	moy	**4,1**	**6,9**	**6,4**	**3,3**	**3,2**
	EC	0,3	0,4	0,6	0,2	0,1
F3 acido-soluble		34,3	45,1	12,9	9,4	7,9
		30,8	46,7	14,6	9,2	8,4
		33,3	50,3	13,7	8,7	8,3
		35,2	-	12,8	9,1	7,4
	moy	**33,4**	**47,4**	**13,5**	**9,1**	**8,0**
	EC	1,4	1,9	0,7	0,2	0,3
F4 réductible		12,4	13,5	12,9	7,4	9,0
		12,3	15,9	11,1	14,4	12,2
		14,8	12,5	11,7	13,0	12,2
		12,1	-	13,1	-	8,6
	moy	**12,9**	**14,0**	**12,2**	**11,6**	**10,5**
	EC	1,0	1,3	0,8	3,7	1,7
F5 oxydable		1,8	1,6	3,4	1,8	2,1
		1,7	1,1	3,8	2,8	2,0
		1,8	1,7	3,1	2,1	3,1
		1,8	-	3,7	-	1,7
	moy	**1,8**	**1,5**	**3,5**	**2,2**	**2,2**
	EC	0,0	0,6	0,3	0,8	0,5
F6 total potentiellement disponible		53,8	69,4	37,8	23,8	25,3
		49,5	72,4	38,8	31,5	28,7
		54,1	73,0	36,0	28,4	29,9
		54,5	-	37,4	-	24,6
	moy	**53,0**	**71,6**	**37,5**	**27,9**	**27,1**
	EC	1,7	1,5	0,7	4,1	2,2

moy : moyenne, EC : écart-type

- : valeur non retenue (aberrante ou volatilisation de l'échantillon)

Tableau 47 : répartition (%) de Mn au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme.

Fractions		Microcosme témoin	Microcosme biostimulé	Microcosme bioaugmenté avec *A. cylindrospora*	Microcosme bioaugmenté avec *C. atrobrunneum*	Microcosme bioaugmenté avec *C. micaceus*
F1 eau		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	moy	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
	EC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
F2 échangeable		0,2	0,1	0,1	0,2	1,0
		0,3	0,1	0,1	0,2	1,1
		0,2	0,1	0,1	0,2	1,0
		0,3	0,2	0,1	0,2	1,1
	moy	**0,3**	**0,1**	**0,1**	**0,2**	**1,1**
	EC	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
F3 acido-soluble		5,5	4,4	5,7	8,8	13,4
		6,0	4,4	6,5	9,8	14,6
		6,4	5,1	6,3	12,0	13,0
		5,6	-	5,3	9,4	13,6
	moy	**5,9**	**4,6**	**5,9**	**10,0**	**13,7**
	EC	0,3	0,3	0,5	1,0	0,5
F4 réductible		15,6	14,9	14,3	14,0	15,9
		16,1	15,8	15,3	19,5	21,9
		15,9	15,6	15,5	18,8	19,3
		15,7	-	13,5	-	18,6
	moy	**15,8**	**15,5**	**14,6**	**17,4**	**18,9**
	EC	0,2	0,4	0,7	2,8	1,7
F5 oxydable		3,5	3,6	5,7	5,5	4,6
		3,3	1,6	5,1	3,9	3,4
		3,4	2,6	5,6	4,8	4,2
		3,0	-	4,9	-	2,9
	moy	**3,3**	**2,6**	**5,3**	**4,8**	**3,8**
	EC	0,1	0,7	0,3	1,8	0,6
F6 total potentiellement disponible		24,8	23,0	25,7	28,5	35,0
		25,7	22,0	26,9	33,4	41,0
		26,0	23,3	27,5	35,8	37,6
		24,7	-	23,7	-	36,2
	moy	**25,3**	**22,8**	**26,0**	**32,6**	**37,5**
	EC	0,5	0,5	1,6	4,5	1,8

moy : moyenne, EC : écart-type

- : valeur non retenue (aberrante ou volatilisation de l'échantillon)

Tableau 48 : répartition (%) de Ni au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme.

Fractions		Microcosme témoin	Microcosme biostimulé	Microcosme bioaugmenté avec *A. cylindrospora*	Microcosme bioaugmenté avec *C. atrobrunneum*	Microcosme bioaugmenté avec *C. micaceus*
F1 eau		0,5	0,3	0,3	0,2	0,2
		0,3	0,3	0,3	0,2	0,4
		0,3	0,3	0,3	0,2	0,2
		0,4	0,3	0,3	0,2	0,2
	moy	**0,4**	**0,3**	**0,3**	**0,2**	**0,3**
	EC	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
F2 échangeable		0,3	0,4	0,3	0,4	0,4
		0,4	0,4	0,3	0,4	0,5
		0,6	0,3	0,3	0,3	0,4
		0,3	0,8	0,3	0,5	0,5
	moy	**0,4**	**0,5**	**0,3**	**0,4**	**0,4**
	EC	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0
F3 acido-soluble		5,0	4,0	7,0	4,4	5,3
		4,9	4,0	9,2	5,4	8,0
		5,2	4,6	8,0	6,5	6,1
		5,1	-	6,9	5,7	7,3
	moy	**5,1**	**4,2**	**7,8**	**5,5**	**6,7**
	EC	0,1	0,3	0,8	0,6	1,0
F4 réductible		38,8	36,5	32,4	36,1	32,9
		36,0	41,3	30,4	43,5	44,2
		35,0	32,2	33,7	37,6	41,3
		34,5	-	37,8	25,1	39,0
	moy	**36,0**	**36,7**	**33,6**	**35,6**	**39,3**
	EC	1,4	3,1	2,2	5,3	3,4
F5 oxydable		4,5	7,0	9,9	7,7	8,1
		4,3	4,1	13,5	4,8	10,2
		5,8	6,2	11,8	8,6	7,0
		6,5	-	12,8	-	6,6
	moy	**5,3**	**5,7**	**12,0**	**7,0**	**8,0**
	EC	0,9	1,1	1,2	1,5	1,2
F6 total potentiellement disponible		49,1	48,2	49,8	48,9	46,9
		45,8	50,1	53,7	54,2	63,3
		46,8	43,6	54,2	53,2	54,9
		46,8	-	58,1	-	53,6
	moy	**47,1**	**47,3**	**53,9**	**48,7**	**54,7**
	EC	1,0	2,4	2,2	2,1	4,4

moy : moyenne, EC : écart-type

- : valeur non retenue (aberrante ou volatilisation de l'échantillon)

Tableau 49 : répartition (%) de Zn au sein des fractions minéralogiques de chaque microcosme.

Fractions		Microcosme témoin	Microcosme biostimulé	Microcosme bioaugmenté avec *A. cylindrospora*	Microcosme bioaugmenté avec *C. atrobrunneum*	Microcosme bioaugmenté avec *C. micaceus*
F1 eau		0,2	0,2	0,3	0,1	0,1
		0,1	0,4	0,2	0,1	0,4
		0,2	0,1	0,2	0,1	0,1
		0,3	0,2	0,4	0,1	0,1
	moy	**0,2**	**0,2**	**0,3**	**0,1**	**0,2**
	EC	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1
F2 échangeable		0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
		0,2	0,2	0,1	0,0	0,1
		0,1	0,0	0,1	0,1	0,1
		0,1	0,5	0,2	0,1	0,0
	moy	**0,1**	**0,2**	**0,1**	**0,1**	**0,1**
	EC	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
F3 acido-soluble		6,6	6,4	7,8	8,5	9,0
		8,0	16,8	9,5	9,5	9,7
		63,0	6,7	8,7	8,9	8,5
		9,7	-	6,8	9,9	9,2
	moy	**21,8**	**9,9**	**8,2**	**9,2**	**9,1**
	EC	20,6	4,6	0,9	0,5	0,4
F4 réductible		39,1	37,4	30,7	32,0	23,3
		39,8	47,8	31,2	33,8	27,9
		69,8	34,1	31,4	30,6	28,3
		45,7	-	35,2	28,5	33,2
	moy	**48,6**	**39,8**	**32,1**	**31,2**	**28,2**
	EC	10,6	5,3	1,5	1,7	2,6
F5 oxydable		5,3	2,1	2,6	1,5	2,0
		2,0	1,5	2,8	2,0	1,4
		10,5	1,8	2,4	3,2	2,3
		1,9	-	4,0	2,0	1,2
	moy	**4,9**	**1,8**	**3,0**	**2,2**	**1,7**
	EC	3,0	0,2	0,5	0,5	0,5
F6 total potentiellement disponible		51,3	46,2	41,5	42,1	34,5
		50,2	66,6	43,8	45,5	39,5
		143,7	42,7	42,8	42,8	39,3
		57,8	-	46,6	40,7	43,8
	moy	**75,7**	**51,8**	**43,7**	**42,8**	**39,2**
	EC	34,0	9,8	1,4	1,4	2,4

moy : moyenne, EC : écart-type

- : valeur non retenue (aberrante ou volatilisation de l'échantillon)

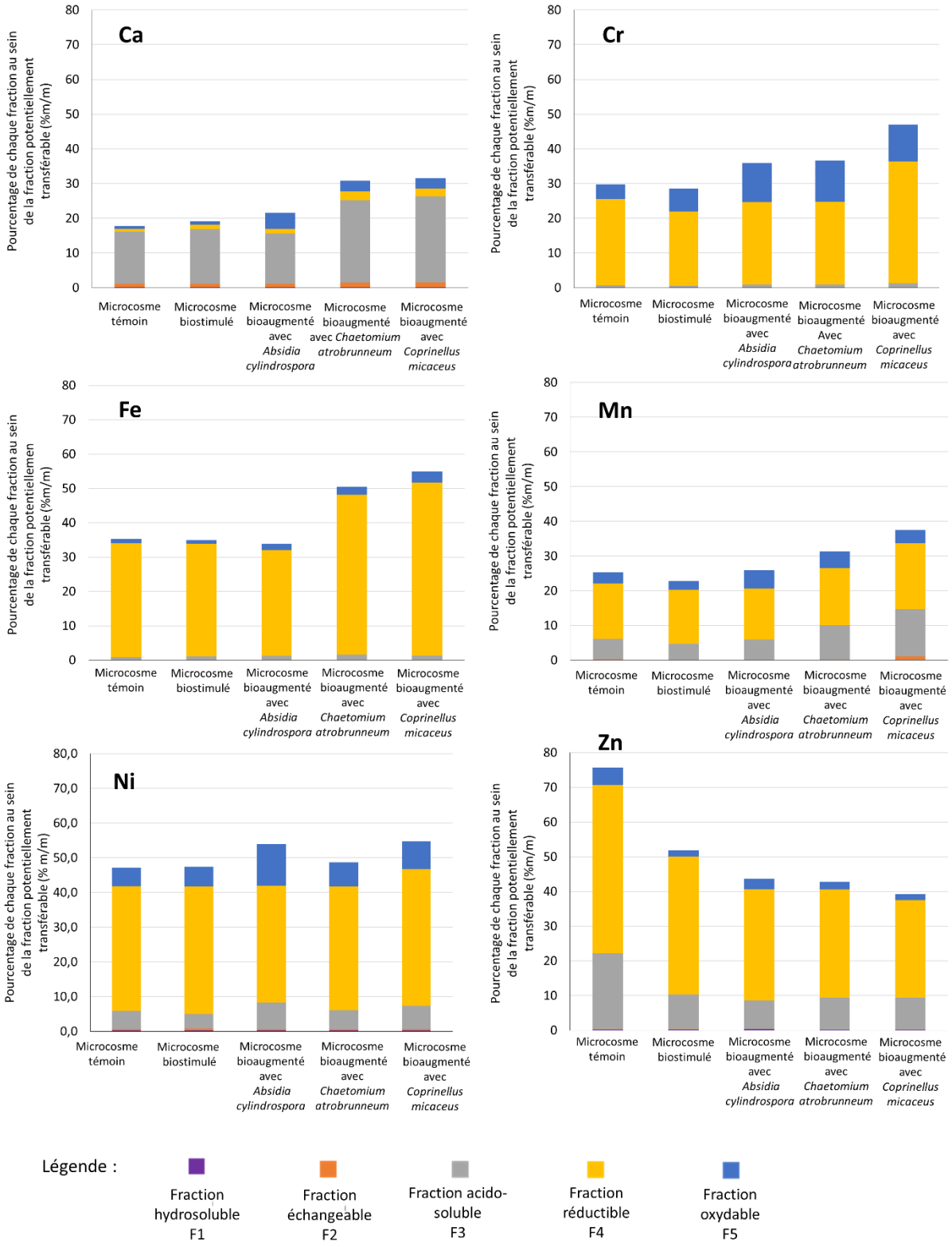


Figure 67 : répartition de Ca, Cr, Fe, Mn, Ni et Zn au sein des différentes fractions potentiellement labiles des sols des microcosmes

Annexe X : publication N°1

Albert Q, Leleyter L, Lemoine M, Heutte N, Rioult J-P, Sage L, Baraud F, Garon D (2018) Comparison of tolerance and biosorption of three trace metals (Cd, Cu, Pb) by the soil fungus *Absidia cylindrospora*. Chemosphere 196:386–392

Chemosphere 196 (2018) 386–392

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Comparison of tolerance and biosorption of three trace metals (Cd, Cu, Pb) by the soil fungus *Absidia cylindrospora*

Quentin Albert [a], Lydia Leleyter [a], Mélanie Lemoine [a], Natacha Heutte [b], Jean-Philippe Rioult [a], Lucile Sage [c], Fabienne Baraud [a], David Garon [a, *]

[a] Normandie Univ, UNICAEN, ABTE EA 4651, Centre F. Baclesse, 14000, Caen, France
[b] Normandie Univ, UNIROUEN, CETAPS EA3 832, 76821, Mont Saint Aignan Cedex, France
[c] Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR 5553 CNRS / USMB Université Grenoble Alpes, 38058, Grenoble, Cedex 9, France

HIGHLIGHTS

- *Absidia cylindrospora* was able to biosorb 68% of Cd, 59% of Pb and 14% of Cu after 3 days of exposure at 50 mg L^{-1}.
- Cd and Pb were mostly absorbed, whereas Cu was mostly adsorbed.
- Cd and Pb inhibited fungal biomass production, but Cu did not.
- pH decreased after 3 and 7 days of Pb exposure and after 7 days of Cd exposure. pH did not change on exposure to Cu.

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 September 2017
Received in revised form
16 December 2017
Accepted 22 December 2017
Available online 28 December 2017

Handling editor: Martine Leermakers

Keywords:
Mycoremediation
Metal tolerance
Metal biosorption
Fungi

ABSTRACT

Trace metals cause deterioration of the soil and constitute a major concern for the environment and human health. Bioremediation could be an effective solution for the rectification of contaminated soils. Fungi could play an important role in biodegradation because of the morphology of their mycelium (highly reactive and extensive biological surface) and its physiology (high tolerance to many stresses, production of enzymes and secondary metabolites). Fungi can effectively biosequestrate, or biotransform many organic and inorganic contaminants into a non-bioavailable form. This experiment was designed to evaluate the tolerance and the biosorption abilities of the fungus *Absidia cylindrospora* against three trace metals: Cadmium (Cd), Copper (Cu), and Lead (Pb). Firstly, the tolerance of the strain was evaluated on metal-enriched malt extract agar (MEA). Secondly, the strain was exposed to trace metals, in a liquid malt extract medium. After 3 or 7 days of exposure, the quantities of absorbed and adsorbed metals were measured with Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES). Biomass production and pH evolution were also evaluated during the test. Our experiment revealed differences between the three metals. In agar medium, Cd and Pb were better tolerated than Cu. In liquid medium, Cd and Pb were mostly absorbed whereas Cu was mostly adsorbed. *A. cylindrospora* biosorbed 14% of Cu, 59% of Pb and 68% of Cd when exposed for 3 days at 50 mg L^{-1}.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

It is estimated that 60% of fertile lands are degraded and their contamination is one of the major threats to soil (Montanarella et al., 2015). There are about 530,000 contaminated sites in the USA (US EPA, 2014) and around 340,000 contaminated sites identified across Europe (European Commission, 2015). In France, there are around 6547 potentially polluted sites, around 38% of them (2508 sites) potentially contaminated by trace metals (Montanarella et al., 2015). Widely used all around the world, trace metals are a major health and environmental concern throughout the world because most of them are not metabolized, and accumulate in the environment. This accumulation is a direct threat to water and food production (Dighton, 2003; Baraud and Leleyter, 2012; Gadd et al., 2014). Soil remediation is becoming a vital method to conserve and restore land safe for food and water production (US EPA, 2013; Adamo et al., 2014). Our interest focuses on

* Corresponding author. Centre F. Baclesse, ABTE EA4651-ToxEMAC, Avenue Général Harris, BP5026, 14076, CAEN, Cedex 05, France
E-mail address: david.garon@unicaen.fr (D. Garon).

https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.156
0045-6535/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

cadmium (Cd), copper (Cu) and lead (Pb) because these trace metals are widely dispersed throughout soil with subsequent transfer to vegetables which can affect both ecosystems and humans (Jolly et al., 2013).

Pb is a major environmental pollutant that persists for decades in the environment. Elevated level of Pb in environmental spheres can cause various damaging effects in plants and animals (Lucas et al., 2012; Wijayawardena et al., 2015). Cd is a widespread pollutant showing carcinogenic effects (Gwaltney-Brant, 2013; Majewska et al., 2007). Cu is a micronutrient but becomes toxic for the biosphere at high concentrations. This is the third most used metal in the world (US EPA, 2013; Zotti et al., 2014).

Biological remediation methods are important because of their cost effectiveness, diversity, eco friendliness, social acceptance and efficiency. Several studies have shown the removal potential of these methods for organic (i.e. polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH) and inorganic pollutants (*i.e.* trace metals) (Khan et al., 2000; Anjum et al., 2015). Phytoremediation in combination with plant promoting microorganisms is a well studied technique (Ullah et al., 2015). Fungi are good candidates to be part of the biotechnological methods (Arora, 2004; Stamets, 2005; Dixit et al., 2015). Mushrooms and molds are well known soil conditioners, pioneer inhabitants, and potential metal bioaccumulators (Baldrian, 2003; Gadd, 2008; García-Delgado et al., 2015). Fungal biosorption is a well-documented phenomenon (Kapoor and Viraraghavan, 1995). Biosorption is the metal binding capacity on the cell wall (adsorption) and within the cell (absorption) (Singh, 2006). Fungi are able to grow in poor and contaminated media, can mobilize nutrients and are known to explore the environment due to their three dimensional sharing cellular network (Fomina and Gadd, 2014; Singh, 2006, 2015). They also produce several secondary metabolites like biosurfactants, enzymes (laccases) and low molecular weight organic acids such as oxalic acid, which can influence metal soil mobilization and enhance their biosorption (Gadd et al., 2014). Several studies have already shown the potential of fungal strains in metal tolerance and biosorption in wastewater treatment (Khan et al., 2000; Say et al., 2001; Fomina et al., 2003; Svecova et al., 2006; Egamberdieva et al., 2016). Metal sequestration by fungi could be an effective strategy to decrease metal bioavailability to the biosphere. *Trametes versicolor* (Lorenzo et al., 2006), *Paecilomyces lilacinus* (Zucconi et al., 2003), *Pleurotus ostreatus* (Javaid et al., 2011; Li et al., 2017), *Rhizopus arrhizus* (Fourest et al., 1994; Ahmad et al., 2005; Naja et al., 2005), *Trichoderma atroviride* (Mohsenzadeh and Shahrokhi, 2014), *Penicillium oxalicum* (Xin et al., 2010) and *Phanerochaete chrysosporium* (Zhao et al., 2016) are some of the well-studied species. It has been suggested that fungi belonging to *Mucoromycotina* could be used in biosorption trials because of their abundant and rapidly growing mycelium (Hoffmann et al., 2013).

This study was designed to evaluate the tolerance and biosorption potential of *A. cylindrospora* to Cd, Cu, and Pb before considering a possible use to treat contaminated soils.

2. Materials and method

2.1. Fungal strain

A. cylindrospora Hagem, 1908 belongs to the division of the *Mucoromycotina*. The strain used here had previously been isolated following the soil plates method of Warcup (1950) from a soil polluted by both polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and trace metals. It has been characterized and tested for its abilities on PAH (fluorene) degradation in a previous study performed in laboratory (Garon et al., 2000). *A. cylindrospora* was preserved in our laboratory's fungal collection at 4 °C (number AcS_2000) and has been reactivated on Malt Extract Agar (MEA) at 25 °C.

2.2. Trace metal tolerance in agar medium

The trace metal tolerance of the fungal strain was evaluated on metal-enriched MEA media in Petri dishes. Sulfate salts are used for Cd and Cu: $CdSO_4$ and $CuSO_4$, $5H_2O$ respectively (Sigma Aldrich, analytical grade), whereas lead nitrate $Pb(NO_3)_2$ (Sigma Aldrich, analytical grade) was chosen for Pb due to the low solubility of $PbSO_4$. Sulfate salts are supposed to be inert for the fungi. Stock solutions are prepared by dissolution of the salt powder in ultra-pure water and stored at 4 °C. The following concentrations were tested: 0 (control); 10; 50; 100, and 1000 mg L^{-1} for Cd, Cu and Pb. Such salts and this range of concentrations are frequently used in biosorption studies (Li et al., 2004, 2009; Xiangliang et al., 2005; Zotti et al., 2014; Nongmaithem et al., 2016; Li et al., 2017).

The fungal strain was deposited in the middle of the trace metal-enriched medium and incubated at 25 °C for 30 days. Each day, the growth diameters of the fungus were recorded. If complete inhibition was observed, the strain was transferred onto MEA medium without metal, in order to test the fungicidal or fungistatic effect. The experiment was performed in triplicate for each metal of interest (Cd, Cu, Pb).

2.3. Biosorption of trace metal in liquid medium

The design of our experiment was based on the publications of Garon et al. (2004), Mouhamadou et al. (2013), and Sage et al. (2014). The fungal strain was exposed to each metal, at two different concentrations (50 and 100 mg L^{-1}) and biosorption was evaluated after 3 and 7 days of exposure. The experiment was performed in triplicate for each metal. Such experimental conditions are similar to those proposed by various authors (Zotti et al., 2014; Nongmaithem et al., 2016; Li et al., 2017).

Fig. 1 diagrammatically represents the stages of this trial. After a 7-days subculture at 20 °C on MEA, mycelium was harvested off the agar surface (about 30 mg dried mass), transferred to 25 mL Malt Extract Broth medium (MEB) and incubated at 20 °C, on a rotary shaker, at 150 rpm. After 3 days of mycelium growth, Cd, Cu or Pb were added from a pre-prepared stock solution (see 2.2). A control was prepared in the same conditions without metal. After 3 or 7 days of exposure under these conditions (20 °C, 150 rpm), the mycelium was filtered on sterile gauze, gently rinsed with 50 mL of ultra-pure water in order to liberate and collect the metal adsorbed on the fungal cell wall (Joshi et al., 2011). The mycelium was then dried at 40 °C until constant mass was reached (about 48 h). During the experiment, the pH was measured (pH 1100 H, VWR®) once before the metal solution addition (pH_1), and then after the end of the metal exposure (pH_2). The obtained values were compared to the initial pH of the culture media (pH_0) (Table 1). Biomass production (dried mass) was measured at the end of the experiment and compared to the control.

At the end of the experiment, three new fractions were obtained: the liquid media (Fraction A); the rinsing water (Fraction B), and the dried mycelium (Fraction C). Fraction A and Fraction C were mineralized before the analysis of the trace metals. An aliquot of 5 mL from Fraction A and all Fraction C were placed separately in hermetic Teflon® tanks and digested in *aqua regia*. *Aqua regia* was prepared as follows: one part HNO_3 65% (Carlo Erba®, analytical grade) added to two parts HCl 37% (Carlo Erba®, analytical grade) and 10 mL of it was added to each hermetic tank. Fraction A and Fraction C were then heated at 175 °C, power 80% in a microwave oven (Speed Oven, Berghof®).

The digests and the rinse water (Fraction B) were filtered on 0.45 µm Millipore membrane filters (Millex®) and analysed in

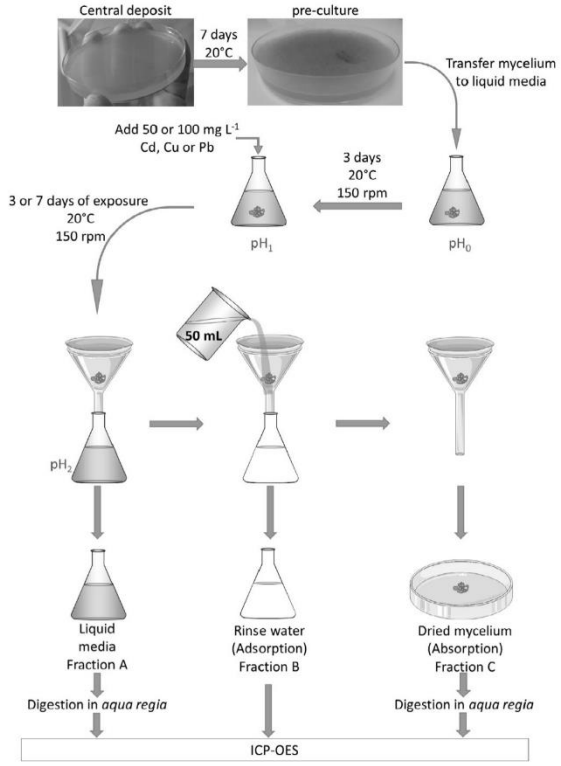


Fig. 1. Schematic representation of the biosorption experiment in liquid media.

triplicate by argon plasma ICP-OES (5100 Agilent Technologies®). The analytical quality of chemical data was validated using standard certified materials HR-1 (Canadian Center for Inland Waters National Laboratory for Environmental Testing). Values of 0.005, 0.03 and 0.03 μg L^{-1} respectively are the ICP-OES limits of detection for Cd, Cu and Pb, calculated as three times the standard deviation of ten blank replicates (Hamdoun et al., 2015).

The percentage of absorbed metal ($\%_{ab}$) was then calculated as the quantity of metal absorbed inside the mycelium (Q_{abs}, Fraction C) divided by the initial quantity of metal in the culture media (Q_0): $\%_{ab} = Q_{abs}/Q_0$ (1).

The percentage of adsorbed metal ($\%_{ad}$) was calculated as the quantity of metal adsorbed on the mycelium cell wall (Q_{ads}, Fraction B) divided by the initial quantity of metal in the culture media (Q_0): $\%_{ad} = Q_{ads}/Q_0$ (2).

Biosorption percentages were calculated as the sum of adsorption and absorption. The biosorption was also evaluated as the quantity of metal biosorbed per mg of dry mycelium biomass.

2.4. Statistical analyses

Exploratory analyses were conducted to compare biomass, absorption, biosorption, pH and metal concentration at time of exposure by using the Wilcoxon exact test. Statistical significance was defined as $P < 0.05$. All analyses were conducted using the SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3. Results and discussion

3.1. Metal tolerance in agar medium

Fig. 2 shows the growth profiles obtained during the tolerance experiment with *A. cylindrospora*. The control (without metal) reached the maximum growth 85 mm after 7 days. For each metal, concentrations over 10 mg L^{-1} can reduce fungal growth. Cadmium was the most tolerated metal and growth was visually significant even at a high concentration (1000 mg L^{-1}) (Fig. 2A). Growth in lead supplemented-medium occurred at 10, 50 and 100 mg L^{-1} but was inhibited at 1000 mg L^{-1}. This high concentration was not fungicidal. Indeed, the mycelium was able to grow again and reached the maximum growth diameter as fast as the control when transferred onto a metal-free medium (Fig. 2C ■). Copper appeared to be the most toxic metal in this experiment. Growth occurred at 10 and 50 mg L^{-1}, was inhibited at 100 mg L^{-1} and proved fungicidal at 1000 mg L^{-1} (Fig. 2B). At 7 days, the concentrations which inhibit 50% of fungal growth (IC50) were 100, 34 and 50 mg L^{-1} for Cd, Cu and Pb, respectively.

Intramatrical growth (without aerial mycelium) of *A. cylindrospora* was visually observed at 1000, 10 and 50 mg L^{-1} of Cd, Pb and Cu, respectively.

A. cylindrospora revealed an original metal tolerance profile, with a very high resistance to Cd (>1000 mg L^{-1}) and was more sensitive to Cu. Mohammadian et al. (2017) studied different fungi and showed different profiles. Among them *Trichoderma harzianum* was able to tolerate Cd up to 35 mg L^{-1} and Cu was better tolerated than Cd (IC50 = 350 mg L^{-1}).

3.2. Biosorption experimentation in liquid medium

3.2.1. pH and fungal biomass growth

Fig. 3 and Table 1 show biomass production and pH measurements respectively under the different conditions of the

Table 1
Monitoring of pH after metal exposure. The value is calculated as the average of 3 replicates (standard deviation in brackets). For each metal, the values followed by different letters are statistically different.

	pH_0	pH_2	
		3 days	7 days
Control medium	5.4 (0.0)	5.4 (0.0)	5.4 (0.0)
Control medium without metal, with mycelium	5.4 (0.0)	4.0 (0.14)	3.6 (0.32)
Control medium with metal, without mycelium	5.4 (0.0)	Cd 5.2 (0.00)	Cd 5.2 (0.00)
		Cu 4.4 (0.00)	Cu 4.4 (0.00)
		Pb 4.9 (0.05)	Pb 4.9 (0.05)
Cd 50 mg L^{-1}	5.4 (0.0)	4.2 (0.06)a	1.8 (0.00)b
Cd 100 mg L^{-1}		4.1 (0.10)a	1.5 (0.00)b
Cu 50 mg L^{-1}	5.4 (0.0)	3.7 (0.00)c	3.8 (0.10)d
Cu 100 mg L^{-1}		3.6 (0.06)c	3.8 (0.12)d
Pb 50 mg L^{-1}	5.4 (0.0)	2.0 (0.00)e	2.1 (0.06)e
Pb 100 mg L^{-1}		1.8 (0.15)f	1.7 (0.05)f

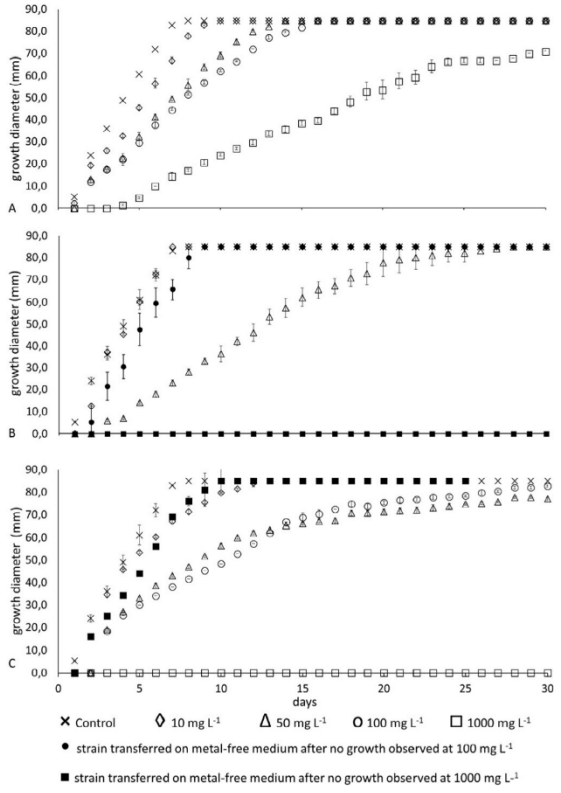


Fig. 2. Growth profiles of A. cylindrospora on metal-enriched MEA with 10, 50, 100 and 1000 mg L^{-1} of Cd (A), Cu (B), or Pb (C). The controls do not contain any metal.

experiment. After 3 days of Cd exposure, the biomass of *A. cylindrospora* represented 100% of the control's biomass (without trace metal) and was significantly different from the biomass at 7 days ($p = 0.0022$) which only reached 65% of the control. After Cu or Pb exposure, biomass production was not statistically different for the two lengths of exposure and the two doses ($p = 0.2403$ and $p = 0.3939$, respectively for Cu and $p = 0.9372$ and $p = 0.9372$, respectively for Pb). After Pb and Cu exposure the biomass of *A. cylindrospora* respectively reached 65% and 100% of the control.

The pH of the control medium (without metal and without mycelium) was stable throughout the experiment and remained at 5.4. We observed that the pH of the control medium with mycelium decreased from 5.4 to 3.6 during the experiment. This decrease is as a result of metabolic activities of the mycelium (Gadd et al., 2014). A similar pH decrease from 5.4 to 4.2 was observed after 3 days of Cd exposure at 50 and 100 mg L^{-1}, respectively. A stronger pH decrease was observed (from 5.4 to less than 2.0) after 7 days of Cd exposure, at both concentrations. Cu induced a small decrease from 5.4 to 3.7 after 3 days at 50 mg L^{-1}. Finally, after Pb exposure, the significant decrease from 5.4 to around 2.0 or less, was observed under each test condition. Statistical analysis showed that the time of exposure was an influent factor on pH for Cd and Cu ($p = 0.0022$ and $p = 0.0325$, respectively), whereas for Pb, the concentration was the influent factor ($p = 0.0108$).

To summarise, Pb appears as the most perturbing element of the 3 metals tested, followed by Cd and finally Cu. Indeed, Pb inhibits biomass production and enhances pH decrease at 50 and 100 mg L^{-1}, after both 3 and 7 days of exposure. Cd inhibits biomass production and enhances pH decrease only after the longest time of exposure (7 days) for both concentrations (50 and 100 mg L^{-1}). Compared to the control, no change in biomass production or in the pH was observed with Cu. An interesting difference was noticed between the tolerance test in agar medium and the biosorption test in liquid medium. During the tolerance test (see 3.1 and Fig. 2), Cu was the most toxic metal. However, in liquid media, this element did not show any inhibition of biomass production, suggesting there was no toxic influence. On the other hand, Cd and Pb, were better tolerated in agar media (see 3.1 and Fig. 2) and more disruptive in liquid media.

In the environment, fungal populations produce low molecular weight organic acids in order to mineralize nutrients and absorb them (Burford et al., 2003; Glasauer et al., 2013). The same phenomenon occurs in metal biosorption. Some are micronutrients and are absorbed for metabolic necessity (Kavanagh, 2005). Toxic trace metals are locked up in cell vacuoles to minimize their toxicity after absorption (Gadd, 2010; Gadd et al., 2014; Baldrian, 2003). Cu might be an inhibitor of the synthesis of the fungal organic acids and reduce the pH decrease observed with Cd and Pb (Sazanova et al., 2015). The possible difference in bioavailability between the agar and the liquid media could partially explain this disparity. The conditions of the experiment are also quite different (shaking, aeration) and may induce variation. However, the different responses observed could also reveal an original mechanism of detoxification. Other studies are needed to understand this further.

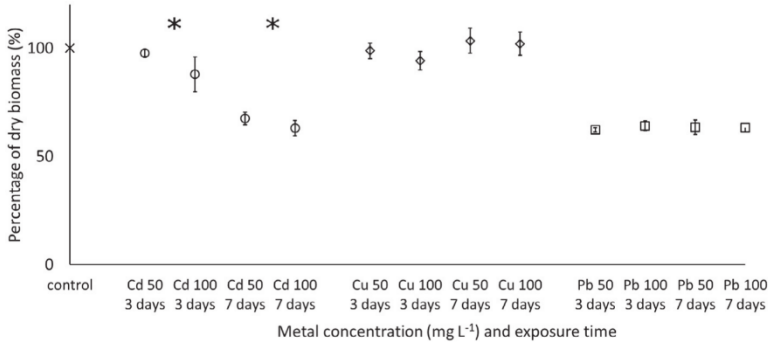


Fig. 3. Evaluation of dry biomass after exposure to trace metal in liquid medium. The two stars mean that biomass values are statistically different after 3 and 7 days of Cd exposure.

3.2.2. Evaluation of the biosorption capacity

Fig. 4 shows the biosorption and absorption percentages measured under the different conditions of our experiment.

On exposure to Cd, the highest biosorption rate (67%) was obtained after 3 days at 50 mg L^{-1}, while biomass and pH remained similar to the control, suggesting no or low metallic stress. In this case, a maximum of biomass is produced and available to biosorb Cd. Absorption is predominant (64%) under these conditions. The absorption percentage is significantly lower after 7 days of exposure ($p = 0.0022$) while pH and biomass are decreased. The increase in metal concentration did not lead to an absorption percentage significantly different ($p = 0.1797$).

On exposure to Pb, the maximum biosorption (59%) was observed, as with Cd, after 3 days at 50 mg L^{-1}. A longer exposure of 7 days did not significantly change the absorption percentage ($p = 0.2403$). At 100 mg L^{-1}, the absorption percentage was significantly lower for both times of exposure (respectively 50% after 3 days and 40% after 7 days; $p = 0.0022$). Here, biomass production and pH are systematically decreased and the maximum biosorption was reached at the lower concentration, after the shorter time of exposure. Time or metal concentration increases may allow expression of the toxicity of the metal and disturb the biosorption process.

On exposure to Cu, the highest biosorption percentages were obtained after 7 days, 20% and 19% for 50 and 100 mg L^{-1} respectively, and were higher than those observed after 3 days of exposure ($p = 0.0022$). Adsorption was greater than absorption (for example, absorption was only 5% after 7 days at 50 mg L^{-1}). Absorption was only predominant after 7 days of exposure at 100 mg L^{-1} (15%). Here, biomass production reached the maximum (100% of the control) under all conditions, so the maximum biosorption was reached after the longest time of exposure.

The biosorption of Cd and Pb was higher after 3 days at 50 mg L^{-1}, while Cu was better biosorbed after 7 days, whatever the concentration. As for pH, statistical analysis showed that the time of exposure drives the absorption percentage for Cd and Cu, whereas for Pb, the concentration of the metal was the controlling factor.

Pb was the most concentrated metal inside the mycelium (Fig. 5) and reached a maximum of 13 μg of metal per mg of mycelium (μg mg^{-1}) at 50 mg L^{-1} after 3 days and 17 μg mg^{-1} at 100 mg L^{-1}. The concentrations of Cd were 7 and 9 μg mg^{-1} respectively, after 3 days, at 50 and 100 mg L^{-1}. In comparison, Li et al. (2017), have studied the biosorption of Cd by *Pleurotus ostreatus* and a maximal absorption of 1.9 μg mg^{-1} was observed at 50 mg L^{-1} after 10 days of exposure. During our experiment described here, this particular strain of *A. cylindrospora* allowed a higher biosorption, but of the same order of magnitude. Taboski et al. (2005), showed that the marine fungal species *Corollospora lacera* was able to biosorb 7.4 μg mg^{-1} of Cd after 30 days and *Monodictys pelagica* to biosorb 15.6 μg mg^{-1} of Pb after 15 days at 50 mg L^{-1}. *A. cylindrospora* has been shown here to be a potentially good Cd and Pb-biosorbant for bioremediation.

In our experiment the Pb and Cd concentrations in the mycelium decreased when the exposure time increases. On the contrary, it increases when the metal concentrations in the medium increase. Li et al. (2004) studied the biosorption of Cd and Pb with *Phanerochaete chrysosporium*. The maximum biosorption was also reached after an exposure at 50 mg L^{-1} and were 15.2 and 12.3 μg mg^{-1} for Cd and Pb, respectively. According to this study, the optimal pH promoting the highest biosorption was 4.5 for both Cd and Pb. The biosorption of the latter was also preferential when the biosorption experiment was performed with both trace metals in the culture medium. An experiment in liquid medium with *A. cylindrospora* exposed to different metals could be an interesting prospect.

After 3 and 7 days of Cu exposure, the concentration in the mycelium reached 2 μg mg^{-1} at 50 mg L^{-1} and 4 μg mg-^{1} at 100 mg L^{-1} respectively. Li et al. (2009) also found that Cu biosorption increase is concomitant with the metal concentration in the medium with other strains such as *Cladosporium cladosporioides*, *Gliomastix murorum* and *Bjerkandera sp.*

Holan and Volesky (1995) studied copper and lead biosorption with *Absidia orchidis*. In this study, the fungal cell wall was chemically modified by the addition of chemical groups like phosphoryl

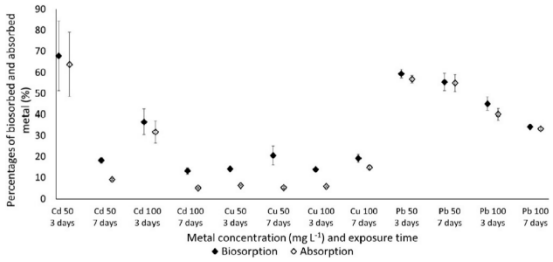


Fig. 4. Fungal biosorption and absorption percentages after metal exposure.

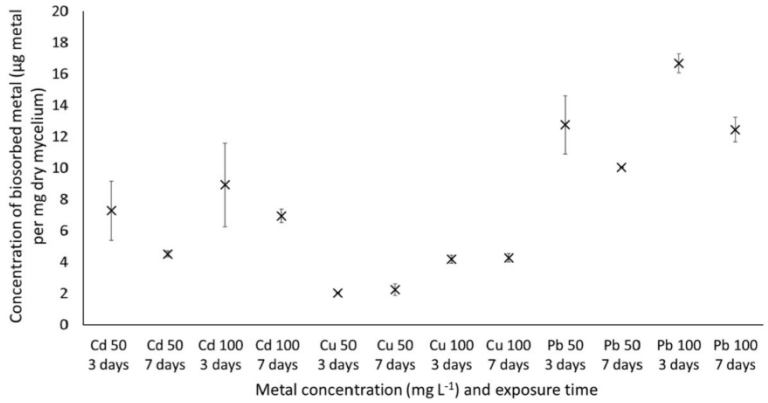


Fig. 5. Concentration of biosorbed metal after 3 and 7 days of exposure.

or sulfoethyl. pH was maintained at 3.5 to enhance biosorption. Under these conditions, *A. orchidis* biosorbed 14 μg mg^{-1} of Pb and 4 μg mg^{-1} of Cd, which is close to our results (13 μg mg^{-1} and 7 μg mg^{-1}, respectively).

In our experiment, Pb is the most accumulated metal, followed by Cd and Cu. Cu appears as the most toxic on agar media but not in liquid medium (see 3.1, Fig. 2C and 3.2). Copper is also the least biosorbed and concentrated by the mycelium with the highest biosorption reached after 7 days at both concentrations. Cd and Pb appear as the less toxic trace metals during the tolerance experiment on agar media (see 3.1). Cd and Pb are better biosorbed after 3 days at 50 mg L^{-1} and absorption is dominant for both. For Cd, the highest biosorption percentage is reached when biomass and pH are close to control conditions. Pb is well absorbed despite the inhibition of biomass production and the pH decrease (see 3.2). The concentration inside the mycelium depends on biomass production, thus on growth conditions and on the tolerance of the strain for the metal in question.

For the three trace metals studied, the biosorption percentages were correlated with the pH measured after exposure to the metal salt (pH_2): $r = 0.93593$ for Cd ($p < 0.0001$); $r = 0.71631$ for Cu ($p = 0.0088$); and $r = 0.71830$ for Pb ($p = 0.0085$). Final biomass production was also correlated with biosorption percentage for Cd ($r = 0.89510$; $p < 0.0001$) and Cu ($r = 0.69930$; $p = 0.0114$). These results suggest that pH and biomass production are important parameters for trace metal biosorption.

4. Conclusion

This experiment was designed to compare the bioaccumulation potential of *A. cylindrospora* exposed to three metals – Cd, Cu, and Pb. This fungal isolate has already demonstrated its ability to degrade PAH (Garon et al., 2000). Our results suggest that *A. cylindrospora* could also be a good biosorbent for trace metals. Tolerance tests on agar media showed that Cd and Pb were well tolerated by *A. cylindrospora*. After only 3 days, *A. cylindrospora* was able to biosorb 14% of Cu. Under the same conditions, this fungus biosorbs more than 50% of Cd and Pb and they are both mostly absorbed. This particular strain of *A. cylindrospora* gave a different response pattern to each metal (stress), but was able to significantly biosorb them under our experimental conditions. Further studies are needed to compare the tolerance and biosorption profiles with others metals and others cultures.

Acknowledgements

We would like to acknowledge Mr Dave Shorten for improving the English of the manuscript.

References

Adamo, P., Iavazzo, P., Albanese, S., Agrelli, D., De Vivo, B., Lima, A., 2014. Bioavailability and soil-to-plant transfer factors as indicators of potentially toxic element contamination in agricultural soils. Sci. Total Environ. 500–501, 11–22.
Ahmad, I., Zafar, Z., Ahmad, F., 2005. Heavy Metal Biosorption potential of *Aspergillus* and *Rhizopus* sp. isolated from Wastewater treated soil. J. Appl. Sci. Environ. 9 (1), 123–126.
Anjum, N.A., Singh, H.P., Khan, M.I.R., Masood, A., Per, T.S., Negi, A., Batish, D.R., Khan, N.A., Duarte, A.C., Pereira, E., Ahmad, I., 2015. Too much is bad—an appraisal of phytotoxicity of elevated plant-beneficial heavy metal ions. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 3361–3382.
Arora, D.K. (Ed.), 2004. Handbook of Fungal Biotechnology, 2. ed. Dekker, New York. and expanded. ed, Mycology series.
Baldrian, P., 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. Enzyme Microb. Technol. 32, 78–91.
Baraud, F., Leleyter, L., 2012. Prediction of phytoavailability of trace metals to plants: comparison between chemical extractions and soil-grown radish. Comptes Rendus Geosci. 344, 385–395.
Burford, E.P., Kierans, M., Gadd, G.M., 2003. Geomycology: fungi in mineral substrata. Mycologist 17, 98–107.
Dighton, J., 2003. Fungi in ecosystem processes, Mycology Series. Dekker, New York.
Dixit, R., Wasiullah, E., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B., Rai, J., Sharma, P., Lade, H., Paul, D., 2015. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. Sustainability 7, 2189–2212.
Egamberdieva, D., Abd-Allah, E.-F., Teixeira da Silva, J.A., 2016. Chapter 20-Microbially Assisted Phytoremediation of Heavy Metal–contaminated Soils. In: Ahmad, P. (Ed.), Plant Metal Interaction. Elsevier, pp. 483–498.
European Commission, 2015. Proposal for a Soil Framework Directive.
Fomina, M., Gadd, G.M., 2014. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. Bioresour. Technol. Special Issue Biosor. 160, 3–14.
Fomina, M., Ritz, K., Gadd, G.M., 2003. Nutritional influence on the ability of fungal mycelia to penetrate toxic metal-containing domains. Mycol. Res. 107, 861–871.
Fourest, E., Canal, C., Roux, J.C., 1994. Improvement of heavy metal biosorption by mycelial dead biomasses (*Rhizopus arrhizus*, *Mucor miehei* and *Penicillium chrysogenum*): pH control and cationic activation. FEMS Microbiol. Rev. 14, 325–332.
Gadd, G.M., 2008. Fungi and Their Role in the Biosphere. In: Jørgensen, S.E., Fath, B. (Eds.), Encyclopedia of Ecology. Elsevier, Amsterdam, pp. 1709–1717.
Gadd, G.M., 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology 156, 609–643.
Gadd, G.M., Bahri-Esfahani, J., Li, Q., Rhee, Y.J., Wei, Z., Fomina, M., Liang, X., 2014. Oxalate production by fungi: significance in geomycology, biodeterioration and bioremediation. Fungal Biol. Rev. 28, 36–55.
García-Delgado, C., Yunta, F., Eymar, E., 2015. Bioremediation of multi-polluted soil by spent mushroom (*Agaricus bisporus*) substrate: polycyclic aromatic hydrocarbons degradation and Pb availability. J. Hazard. Mater. 300, 281–288.
Garon, D., Krivobok, S., Seigle-Murandi, F., 2000. Fungal degradation of fluorene. Chemosphere 40, 91–97.
Garon, D., Sage, L., Wouessidjewe, D., Seigle-Murandi, F., 2004. Enhanced degradation of fluorene in soil slurry by *Absidia cylindrospora* and maltosyl-cyclodextrin. Chemosphere 56, 159–166.
Glasauer, S.M., Beveridge, T.J., Burford, E.P., Harper, F.A., Gadd, G.M., 2013. Metals and metalloids, transformation by microorganisms. In: Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Elsevier, pp. 1–11.
Gwaltney-Brant, S.M., 2013. Heavy metals. In: Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Elsevier, pp. 1315–1347.
Hamdoun, H., Van-Veen, E., Basset, B., Lemoine, M., Coggan, J., Leleyter, L., Baraud, F., 2015. Characterization of harbor sediments from the English Channel: assessment of heavy metal enrichment, biological effect and mobility. Mar. Pollut. Bull. 90, 273–280.
Hoffmann, K., Pawłowska, J., Walther, G., Wrzosek, M., de Hoog, G.S., Benny, G.L., Kirk, P.M., Voigt, K., 2013. The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. Persoonia 30, 57–76.
Holan, Z.R., Volesky, B., 1995. Accumulation of cadmium, lead, and nickel by fungal and wood biosorbents. Appl. Biochem. Biotechnol. 53, 133–146.
Javaid, A., Bajwa, R., Shafique, U., Anwar, J., 2011. Removal of heavy metals by adsorption on *Pleurotus ostreatus*. Biomass Bioenergy 35, 1675–1682.
Jolly, Y.N., Islam, A., Akbar, S., 2013. Transfer of metals from soil to vegetables and possible health risk assessment. SpringerPlus 2, 385.
Joshi, P.K., Swarup, A., Maheshwari, S., Kumar, R., Singh, N., 2011. Bioremediation of heavy metals in liquid media through fungi isolated from contaminated sources. Indian J. Microbiol. 51, 482–487.
Kapoor, A., Viraraghavan, T., 1995. Fungal biosorption — an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. Bioresour. Technol. 53, 195–206.
Kavanagh, K. (Ed.), 2005. Fungi: Biology and Applications. Wiley, Chichester.
Khan, A.G., Kuek, C., Chaudhry, T.M., Khoo, C.S., Hayes, W.J., 2000. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. Chemosphere 41, 197–207.
Li, Q., Wu, S., Liu, G., Liao, X., Deng, X., Sun, D., Hu, Y., Huang, Y., 2004. Simultaneous biosorption of cadmium (II) and lead (II) ions by pretreated biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. In: Sep. Purif. Technol., A selection of papers on Environmental Technologies and Membrane Separation presented at the 17th International Symposium on Chemical Reaction Engineering, 34, pp. 135–142.
Li, X., Xu, Q., Han, G., Zhu, W., Chen, Z., He, X., Tian, X., 2009. Equilibrium and kinetic studies of copper(II) removal by three species of dead fungal biomasses. J. Hazard. Mater. 165, 469–474.
Li, X., Wang, Y., Pan, Y., Yu, H., Shen, X., Jiao, X., Wu, Y., La, S., Yuan, K., Zhang, G., 2017. Mechanisms of Cd and Cr removal and tolerance by macrofungus *Pleurotus ostreatus* HAU-2. J. Hazard. Mater. 330, 1–8.
Lorenzo, M., Moldes, D., Sanromán, M., 2006. Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. Chemosphere 63, 912–917.
Lucas, J.-P., Le Bot, B., Glorennec, P., Etchevers, A., Bretin, P., Douay, F., Sébille, V., Bellanger, L., Mandin, C., 2012. Lead contamination in French children's homes and environment. Environ. Res. 116, 58–65.
Majewska, M., Kurek, E., Rogalski, J., 2007. Microbially mediated cadmium sorption/desorption processes in soil amended with sewage sludge. Chemosphere 67, 724–730.
Mohammadian, E., Babai Ahari, A., Arzanlou, M., Oustan, S., Khazaei, S.H., 2017. Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanjan Province, Iran. Chemosphere 185, 290–296.
Mohsenzadeh, M., Shahrokhi, F., 2014. Biological removing of Cadmium from

contaminated media by fungal biomass of *Trichoderma species*. J. Environ. Health Sci. Eng. 12, 102.
Montanarella, L., Badraoui, M., Chude, V., Costa Dos Santos Baptista, I., Mamo, T., Yemefack, M., Singh Aulakh, M., Yagi, K., Young Hong, S., Vijarnsorn, P., Zhang, G.L., Arrouays, D., Black, H., Krasilnikov, P., Sobocka, J., Alegre, J., Henriquez, C., Mendonça-Santos, M., Taboada, M., Espinosa-Victoria, D., AlShankiti, A., AlaviPanah, S.K., El-Sheikh, E.A.E.M., Hempel, J., Pennock, D., Camps Arbestain, M., McKenzie, N., 2015. The status of the World's soil resources (main report). Food Agric. Organ. U.N. 1–608.
Mouhamadou, B., Faure, M., Sage, L., Marçais, J., Souard, F., Geremia, R., 2013. Potential of autochthonous fungal strains isolated from contaminated soils for degradation of polychlorinated biphenyls. Fungal Biol. 117, 268–274.
Naja, G., Mustin, C., Berthelin, J., Volesky, B., 2005. Lead biosorption study with *Rhizopus arrhizus* using a metal-based titration technique. J. Colloid Interface Sci. 292, 537–543.
Nongmaithem, N., Roy, A., Bhattacharya, P.-M., 2016. Screening of *Trichoderma* isolates for their potential of biosorption of nickel and cadmium. Braz. J. Microbiol. 47, 305–313.
Sage, L., Périgon, S., Faure, M., Gaignaire, C., Abdelghafour, M., Mehu, J., Geremia, R.A., Mouhamadou, B., 2014. Autochthonous ascomycetes in depollution of polychlorinated biphenyls contaminated soil and sediment. Chemosphere 110, 62–69.
Say, R., Denizli, A., Yakup Arıca, M., 2001. Biosorption of cadmium(II), lead(II) and copper(II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Bioresour. Technol. 76, 67–70.
Sazanova, K., Osmolovskaya, N., Schiparev, S., Yakkonen, K., Kuchaeva, L., Vlasov, D., 2015. Organic acids induce tolerance to zinc- and copper-exposed fungi under various growth conditions. Curr. Microbiol. 70, 520–527.
Singh, H., 2006. Mycoremediation: Fungal Bioremediation. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J.
Singh, J.S., 2015. Microbes: the chief ecological engineers in reinstating equilibrium in degraded ecosystems. Agric. Ecosyst. Environ. 203, 80–82.
Stamets, P., 2005. Mycelium Running: How Mushrooms Can Help Save the World. Ten Speed Press, Berkeley, Calif.
Svecova, L., Spanelova, M., Kubal, M., Guibal, E., 2006. Cadmium, lead and mercury biosorption on waste fungal biomass issued from fermentation industry. I. Equilib. Stud. Sep. Purif. Technol. 52, 142–153.
Taboski, M.A.S., Rand, T.G., Piorko, A., 2005. Lead and cadmium uptake in the marine fungi *Corollospora lacera* and *Monodictys pelagica*. FEMS Microbiol. Ecol. 53, 445–453.
Ullah, A., Heng, S., Munis, M.F., Fahad, S., Yang, X., 2015. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review. Environ. Exp. Bot. 117, 28–40.
US EPA, O., 2013. Framework for Metals Risk Assessment [WWW Document]. US EPA. https://www.epa.gov/risk/framework-metals-risk-assessment (Accessed 6.20.17).
US EPA, O., 2014. Issue Paper on the Ecological Effects of Metals [WWW Document]. US EPA. https://www.epa.gov/osa/issue-paper-ecological-effects-metals (Accessed 6.20.17).
Warcup, J.H., 1950. The soil-plate method for isolation of fungi from soil. Nature 166, 117–118.
Wijayawardena, M.A.A., Naidu, R., Megharaj, M., Lamb, D., Thavamani, P., Kuchel, T., 2015. Using soil properties to predict in vivo bioavailability of lead in soils. Chemosphere 138, 422–428.
Xiangliang, P., Jianlong, W., Daoyong, Z., 2005. Biosorption of Pb(II) by *Pleurotus ostreatus* immobilized in calcium alginate gel. Process Biochem. 40, 2799–2803.
Xin, B., Chen, G., Zheng, W., 2010. Bioaccumulation of Cu-complex reactive dye by growing pellets of *Penicillium oxalicum* and its mechanism. Water Res. 44, 3565–3572.
Zhao, M., Zhang, C., Zeng, G., Cheng, M., Liu, Y., 2016. A combined biological removal of Cd^{2+} from aqueous solutions using *Phanerochaete chrysosporium* and rice straw. Ecotoxicol. Environ. Saf. 130, 87–92.
Zotti, M., Di Piazza, S., Roccotiello, E., Lucchetti, G., Mariotti, M.G., Marescotti, P., 2014. Microfungi in highly copper-contaminated soils from an abandoned Fe–Cu sulphide mine: growth responses, tolerance and bioaccumulation. Chemosphere 117, 471–476.
Zucconi, L., Ripa, C., Alianiello, F., Benedetti, A., Onofri, S., 2003. Lead resistance, sorption and accumulation in a *Paecilomyces lilacinus* strain. Biol. Fertil. Soils 37, 17–22.

Annexe XI : publication N°2

Albert Q, Leleyter L, Lemoine M, Heutte N, Rioult J-P, Sage L, Baraud F, Garon D (2018) Selection of soil fungi with high tolerance and biosorption of three trace metals (Cd, Cu, and Pb).

A soumettre.

Selection of soil fungi with high tolerance and biosorption of three trace metals (Cd, Cu, Pb)

Quentin Albert[a], Fabienne Baraud[a], Lydia Leleyter[a], Mélanie Lemoine[a], Natacha Heutte[b], Jean-Philippe Rioult[a], Lucile Sage[c] and David Garon[a*]

[a] *Normandie Univ, UNICAEN, ABTE EA 4651, Centre F. Baclesse, 14000 Caen, France*

[b] *Normandie Univ, UNIROUEN, CETAPS EA3832, 76821 Mont Saint Aignan cedex, France*

[c] *Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR 5553 CNRS / USMB Université Grenoble Alpes, 38058 Grenoble Cedex 9, France*

* Corresponding author:
David GARON
ORCID: 0000-0003-3545-6641
+33 2 31 45 52 21
e-mail: david.garon@unicaen.fr

Present Address:
Centre F. Baclesse, ABTE EA4651-ToxEMAC,
Avenue Général Harris,
BP5026, 14076 CAEN Cedex05, France

Trace metal contamination is a widespread and complex environmental problem. Because fungi are pioneer and engineer species in soils, capable of growing in adverse environments, several fungal species have an interesting potential in bioremediation. This study proposes to test the ability to tolerate and biosorb three trace metals (Cd, Cu and Pb) of 28 fungal isolates collected from different soils. First, a tolerance assay in agar medium was performed. Each isolate was grown in the presence of Cd, Cu, and Pb at different concentrations. Then, we exposed each soil fungus to 50 mg L^{-1} of Cd, Cu, or Pb during 3 days in liquid medium. Parameters such as biomass production, pH, and biosorption were evaluated. The results showed that responses to metal exposure are very diverse even with fungi isolated from the same soil sample, or belonging to the same genera. Several isolates could be considered as good metal biosorbents and could be used in future mycoremediation studies. Among the 28 fungi tested, *Absidia cylindrospora* biosorbed more than 45% of Cd and Pb, *Chaetomium atrobrunneum* biosorbed more than 45% of Cd, Cu, Pb, and *Coprinellus micaceus* biosorbed 100% of Pb.

Keywords: biosorption, metal, soil fungi, tolerance

Introduction

Soil contamination is a widespread problem in many countries. Trace metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) contamination of lands are some of the most important and complex types of pollution in the world (Adamo et al. 2014). Several studies already showed the bioremediation potential of fungi in PAH biodegradation (Rafin et al. 2000; Saxena et al. 2007; Bouchiat et al. 2015; Marchand et al. 2017). The behavior of trace metals is hardly predictable because of their dynamic physico-chemical properties shaped by the properties of the soil matrix (Young 2013; Bolan et al. 2014; Gadd 2017). Cadmium (Cd), copper (Cu) and lead (Pb) are three frequent and toxic trace metals found as soil contaminants (Stolte et al. 2015). Metals are unmetabolized or slightly metabolized (Fomina and Gadd 2014). Biodegradation methods

using living organisms are therefore not applicable, except for volatilization techniques concerning metalloids like mercury or selenium, but such technology could result in secondary metal spreading (Kurniati et al. 2014; Xu et al. 2015). Biostabilization and bioaccumulation strategies are low-cost and more appropriate. They could effectively reduce bioavailability and toxicity of the trace metals targeted. Bioextraction is another effective strategy which allows to reduce the amounts of pollutants (Soares and Soares 2013). Many organisms including bacteria (Bravin et al. 2010; Ullah et al. 2015; Marques 2016), plants and the rhizosphere (An 2004; Baraud and Leleyter 2012; Bes et al. 2013), as well as fungi (Fomina et al. 2003; Crane et al. 2010; Singh 2015) are able to biosorb trace metals. Several studies give information about metal remediation with fungi (Danesh et al. 2013; Goltapeh et al. 2013; García-Delgado et al. 2013; Kumari et al. 2015; Chen et al. 2016; Gadd 2017; Ali et al. 2017; Chatterjee et al. 2017). Due to their efficient adaptation in mineral nutrients intake and their high tolerance to unfavorable, even toxic environments, fungi have a strong potential in trace metals bioaccumulation in order to rehabilitate soils (Fomina and Gadd 2014; Zotti et al. 2014; Liu et al. 2017).

The bioaccumulation of trace metals by mycelium involves biosorption interactions between the metallic ions and the cell wall, including chemical groups like -COOH, -SH, -OH, -NH_2, -PO_4H_2 (Singh H 2006; Singh JS 2015). Several authors showed that metal biosorption by fungi generally suited the Langmuir or the Freundlich model, which is also in agreement with the central role of the fungal cell wall (Li et al. 2004; Li et al. 2009; Velmurugan et al. 2010). Metallic environments may induce the fungal production of secondary metabolites (oxalic acid, metallothionein, thiols) as detoxifiers which can shape trace metal mobilization and enhance interactions with the cell wall and the biosorption process (Gadd 2007; Sterflinger et al 2010; Martino and Perotto 2010; Fomina 2010; Fomina and Gadd 2014; Gadd et al. 2014; 2017). Ceci et al. (2015) also showed that oxalate is one of the main fungal agent of Pb bio-

mineralization. However, Rhee et al. (2012) showed that fungi could also turn Pb into an insoluble form (pyromorphite, $Pb_5(PO_4)_3Cl$), which becomes immobilised, consequently avoiding its biosorption and toxicity. These studies highlight the complex interactions between fungi and trace metals.

The aim of this study is to evaluate the abilities of several fungal isolates to tolerate and biosorb Cd, Cu and Pb. A screening experiment including 28 fungal isolates collected from different soils was performed to select efficient fungi before their use in soil microcosms.

Materials and methods

Fungal isolates

Table 1 gives an overview of the 28 fungal isolates and their origins. Twenty-one fungi were isolated from industrially contaminated sites following Warcup's soil plate method (1950) and seven other fungi were isolated from sporophores growing on a natural forest soil. Small pieces of sporophores (4 x 4 mm) were superficially disinfected with 70% alcohol during 1 min, and plated in malt extract agar (MEA) medium until the development of mycelium. The mycelium grown was immediately subcultured on fresh MEA medium. All isolates were preserved on MEA or potato dextrose agar (PDA) in the laboratory mycological bank (stored at 4°C).

The identification of the isolates was based on both morphological and molecular analyses. The morphological analyses was performed by visual and microscopic observations (Olympus CX 31®), looking for morphological identification characteristics (Booth 1971; Domsch 1980; Courtecuisse and Duhem 2013). The molecular identification was based on ITS sequencing, using ITS1/ITS4 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' - 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') or ITS5/ITS4 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3' - 5'-

TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') primers (Schoch et al. 2012; Toju et al. 2012; Narendrula-Kotha and Nkongolo 2017). The DNA was first extracted from a pure culture on agar media using a specific kit (Nucleo Spin Plant® II, Macherey-Nagel®) following the protocol of the manufacturer. A PCR was performed to obtain the targeted amplicons (annealing temperature: 52°C, 30 cycles within a thermocycler Eppendorf Mastercycler Personal®). The sequenced amplicons (GATC®) were compared with databanks like BLAST (NCBI) and MycoBank (Robert et al. 2013). An identification was considered positive when the analogy and recovery were at least equal to 98% and were confirmed by microscopic observations.

Trace Metals and analyses by ICP-OES

The following salts were used in every experiment: cadmium sulfate ($CdSO_4$), copper sulfate pentahydrate ($CuSO_4$, 5 H_2O), and lead nitrate ($Pb(NO_3)_2$) (Sigma Aldrich®, analytical grade). Stock solutions (1g L^{-1}) were prepared by dissolution of the corresponding salt mass in ultra-pure water and stored at 4°C. These stock solutions were used to prepare the metal-enriched media. Trace metals were analysed by argon Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry (ICP-OES 5100 – Agilent technologies®) in every experiments. The analytical quality of chemical data was validated using standard certified materials HR-1 (sediments, Canadian Center for Inland Waters National Laboratory for Environmental Testing) and CSM-2 (*Agaricus campestris*, LGC Standards®). The values of 0.005, 0.03 and 0.03 mg L^{-1} are respectively the ICP-OES limits of detection for Cd, Cu and Pb, calculated as three times the standard deviation of ten blank replicates (Hamdoun et al. 2015).

Tolerance in agar media

Metal-enriched media (MEA or PDA) containing 10; 50; 100 mg L^{-1} of one metal were prepared by diluting the stock solution in the media; for 1000 mg L^{-1}, the appropriate mass of salt was directly dissolved in the media. Each strain was centrally deposited in enriched-MEA or PDA, in Petri dishes, and incubated at 25°C. During 30 days, the growth diameters were recorded every day and compared, for each strain, to the growth diameter obtained without metal (referred as control), in the same conditions. The tolerance assay was performed in triplicate for each isolate, each metal, and each metal concentration. The highest tolerated concentrations, which allowed visual growth of the mycelium (compared to control) were recorded for each metal.

Biosorption in liquid medium

A preliminary study using *Absidia cylindrospora* (referred as number AcS_2000 in the laboratory collection) allowed to define parameters such as exposure times and metal concentrations (Albert et al. 2018). This previous study showed that fungal biosorption abilities are higher after an exposure of 3 days at 50 mg L^{-1} for these three metals. These conditions were also mentioned with others strains (Ascomycota and Basidiomycota) in previous studies (Li et al. 2004; Zotti et al. 2014; Nongmaithem et al. 2016; Li et al. 2016).

First, a subculture of 10 or 20 days on the appropriate solid media (MEA or PDA) at 20 °C was necessary to obtain about 30 mg of fungal biomass (dry mass). Fresh mycelium was harvested from the subculture and transferred in 25 mL of the appropriate broth media (Table 1). After a period of 3 days at 20°C, on a rotary shaker at 150 rpm, 50 mg L^{-1} of Cd, Cu or Pb were added in the liquid medium. After 3 days of exposure (20°C, 150 rpm), the myceliums were filtered on sterile gauze, then gently rinsed twice with 25 mL of distilled water in order to desorb trace metals eventually adsorbed on the mycelium cell wall. The dried myceliums (40°C, at least 72h until constant mass) were then placed in Teflon® hermetic tank and 10 mL of *aqua regia* were added to digest the dried biomass as previously described (Albert et al. 2018). Each fungal isolate was tested in triplicate with each metal. Trace metals were then analysed in the rinsing water and in the digests (ICP-OES 5100 – Agilent technologies®). The percentages of

absorbed ($\%_{ABS}$) and adsorbed ($\%_{ADS}$) metal were then determined as the quantity of metal absorbed (Q_{ABS}), or adsorbed (Q_{ADS}), by the mycelium divided by the initial quantity of metal in the culture media (Q_0). Biosorption percentages were calculated as the sum of adsorption and absorption.

$$\%_{ABS} = Q_{ABS}/Q_0 \quad (1)$$

$$\%_{ADS} = Q_{ADS}/Q_0 \quad (2)$$

To give complementary information, the biosorption was also evaluated as the quantity of metal biosorbed per mg of dry mycelium biomass. A control experiment, without metal, was performed in triplicate for each fungal isolate.

The pH of the media was measured before and after metal exposure. The fungal biomass produced at the end of the experiment was also recorded. The pH and the biomass of each fungal isolate were compared to their relative controls. The pH variation (ΔpH) is given as the variation between the control (pH_C) and the experiment (pH_E):

$$\Delta pH = pH_E - pH_C \quad (3)$$

The biomass production is given as a percentage of the controls (growth without metal).

Statistical analyses

Exploratory analyses were conducted to highlight correlations between different parameters such as biomass, biosorption percentages, pH, and finally the metal concentration inside the mycelium, by using the correlation exact test. Statistical significance was defined as $P<0.05$. All analyses were conducted using the SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results

Cadmium

Absidia cylindrospora is the only isolate able to tolerate Cd until 1000 mg L^{-1} (table 2). Eleven of the twelve Ascomycota tested in the study tolerated up to 100 mg L^{-1}, five of them belong to the Sordariales order. Only half of the Basidiomycota (6/15) tolerated up to 100 mg L^{-1} of Cd (five Agaricales and one Polyporales).

The mean of the biomass production after Cd exposure reached 68% of the controls (from 36% to 100%). The mean of the pH variations after Cd exposure reached +0.2 compared to the controls (from -0.5 with *Humicola sp* to +1.8 with *Pleurotus ostreatus*). These variations in pH were not statistically different ($p = 0.06$) from the initial pH of the culture medium.

The minimum biosorption was of about 10% and eight species biosorbed more than 30% of Cd and up to 14.2 mg per g of dry mycelium (figures 1 and 2). The statistical analysis showed that the Cd biosorption percentages were respectively correlated with the concentrations of Cd inside the mycelium ($r = 0.30179$; $p = 0.0053$). The maximum was reached by *Emericellopsis minima* (49%), followed by *Chaetomium atrobrunneum* (51%), *Absidia cylindrospora* (43%), *Perenniporia fraxinea* (41%), *Coprinellus xanthothrix (41%), Agaricus arvensis* (36%), *Sordaria lappae* (34%), and *Humicola sp* (33%). Six of these species were isolated from metal contaminated soils (soils 3, and 4), but the Cd concentrations were inferior to our detection limit. *A. cylindrospora* has been isolated from a soil whose Cd concentration was evaluated at 12 mg kg^{-1} (soil 1). *Agaricus arvensis* came from a natural forest soil (soil 2) in which Cd was quantified at 1.5 mg kg^{-1}. During the Cd exposure experiment, *Humicola sp* and *H. fuscoatra* revealed different behavior despite their taxonomic proximity. Even if they both tolerated up to 100 mg L^{-1} of Cd in agar medium, *Humicola sp* biosorbed much more Cd (33%) than *H. fuscoatra* (7%). These two species were isolated from metal contaminated soils

without Cd (soils 3 and 4). The two *Chaetomium* species of the study were isolated from the same soil with no Cd contamination (soil 3) but tolerated Cd up to 100 mg L^{-1}. However, *Chaetomium atrobrunneum* biosorbed 51% of Cd whereas *C. gracile* only biosorbed 29%. The two *Coprinellus* isolates show similar Cd tolerance (100 mg L^{-1}) but different biosorption abilities (40 and 27%). The two *Pleurotus* (28 and 23%), and the two *Agaricus* (35 and 23%) isolates also show similar Cd tolerance and biosorption abilities.

Copper

Seven Ascomycota and five Basidiomycota tolerated Cu up to 100 mg L^{-1}. *Fusarium oxysporum* is the only isolate able to tolerate Cu up to 1000 mg L^{-1} in agar medium (table 2).

The mean of the biomass production after Cu exposure reached 72% of the controls (from 33% to 100%). The mean of the pH variations after Cu exposure reached -0.4 compared to the controls. These variations in pH are statistically different ($p = 1.69.10^{-9}$) from the initial pH of the culture medium. We observed a decrease in pH after Cu exposure except for *Pleurotus pulmonarius* (+1.1) and *Coprinellus micaceus* (+1.1).

Biosorption rates reached a maximum of 42% with *Chaetomium atrobrunneum* and 13.2 mg per g of dry mycelium for *Phaeophlebiopsis peniophoroides* (figures 1 and 2). Only five other species biosorbed more than 30% of Cu: *Sordaria lappae* (38%), *Perenniporia fraxinea* (35%), *Pseudeurotium bakeri* (33%), *Emericellopsis minima* (33%) and *Humicola sp* (32%). These isolates (except *Pseudeurotium bakeri)* were also among the most efficient in Cd biosorption (figure 1). They were isolated from a soil contaminated by Cu (345 mg kg^{-1} in soil 3, and 100 mg kg^{-1} in soil 4). According to our results, fungi isolated from Cu-contaminated soil were the most tolerant and the best biosorbents for this metal, except for the two *Agaricus* species.

As for Cd, biosorption of Cu by *Chaetomium atrobrunneum* (42%) was higher than biosorption by *Chaetomium gracile* (29%). However, unlike for Cd, *Humicola sp* biosorbed Cu (32%) better than *Humicola fuscoatra* (20%). The two *Coprinellus* species showed similar tolerance (100 mg L^{-1}) and biosorption percentages: 25% and 28%. The two *Pleurotus* species (24 and 28%) and the two *Agaricus* (18 and 21%) revealed similar tolerance and biosorption abilities for this metal. Despite his high tolerance to Cu and biomass production (82%), *Fusarium oxysporum* did not reveal a higher biosorption percentage than 18.2%.

Lead

Pb is the best tolerated and biosorbed metal in the present study. Nine isolates (three Ascomycota and six Basidiomycota) tolerate up to 1000 mg L^{-1} of Pb and fourteen isolates (six Ascomycota and eight Basidiomycota) tolerate up to 100 mg L^{-1} (table 2).

The mean of the biomass production after Pb exposure reached 92% of the controls (from 43% to 130%). The mean of the pH variations after Pb exposure reached +0.1 compared to the controls (from -0.4 to +1.1). These variations in pH are not statistically different ($p = 0.08$) from the initial pH of the culture medium.

Coprinellus micaceus highlighted the best biosorption percentage: after 3 days of exposure at 50 mg L^{-1}, this isolate was able to biosorb 100% of the Pb present in the medium i.e.28.0 mg per g of dry mycelium (figures 1 and 2). *Coprinellus micaceus* is also able to tolerate 100 mg L^{-1} in agar medium. The statistical analysis showed that the Pb biosorption percentages were respectively correlated with the concentration of Pb inside the mycelium ($r = 0.58905$; $p < 0.0001$). Twenty-two isolates were able to biosorb more than 30% of Pb and eleven of them biosorbed between 70% and 90%: *Xylaria sp* (90%), *Penicillium oxalicum* (89%), *Humicola sp* (79%), *Humicola fuscoatra* (79%), *Chaetomium gracile* (78%), *Laetiporus sulphureus* (77%), *Fomes fomentarius* (76%), *Psathyrella candolleana* (74%), *Schizophyllum commune* (73%),

Phaeophlebiopsis peniophoroides (72%), and *Megacollybia platyphylla* (72%). Among these isolates, *Megacollybia platyphylla, Laetiporus sulphureus*, and *Fomes fomentarius* came from a forest soil with a low Pb concentration (3.9 mg kg^{-1}). However, many Basidiomycota are known to biosorb toxic substances, and particularly metals like Pb, from their environment (García et al. 2009).

The two *Chaetomium* isolates biosorbed 78% and 68% respectively for *Chaetomium gracile* and *C. atrobrunneum*. The last biosorbed less Pb, but tolerated until 100 mg L^{-1} and biosorbed more Cd and Cu. *Humicola sp* and *H. fuscoatra* biosorbed both 80% of Pb. *Coprinellus xanthothrix* biosorbed only 21%, whereas *C. micaceus* biosorbed 100% of Pb. *Pleurotus ostreatus* biosorbed 3 times more than *P. pulmonarius* (65% versus 21%) and they both tolerated a maximum of 10 mg L^{-1} of Pb. In contrast, the two *Agaricus* revealed similarities in Pb biosorption, 33% for *Agaricus bisporus* and 39% for *A. arvensis*, and they both tolerated up to 1000 mg L^{-1} of Pb.

Discussion

Influence of trace metal

Our results showed that Pb is the most tolerated and biosorbed metal, followed by Cd and Cu. Chen et al. (2015) studied the excretion profile of *Phanerochaete chrysosporium* under Cd stress and highlighted an increase in oxalate production induced by Cd stress, confirming the detoxifying role of the oxalate. Miersch et al. (2001) revealed that thiol production by *Mucor racemosus* (Mucoromycota) was increased after Cd and Cu exposure and Jaeckel et al. (2005) showed that Cd stress induced metallothionein and phytochelatin production by fungi. Sazanova et al. (2015) have studied the biosorption of Cu with *Aspergillus niger* and *Penicillium citrinum*. They found that Cu do not induce oxalate production by these isolates, which seems to be different than Cd and could explain some differences observed between the metals in tolerance and biosorption and also suggests that there are different ways of detoxification. The production, or not, of such metabolites is considered as a major metal detoxification strategy. The diversity of the defense mechanisms may explain the diversity of the biosorption abilities (Baldrian 2003; Fomina et al. 2003; Glasauer et al. 2013).

Cu is the less tolerated and biosorbed metal. Cu is a well-known and widely used antifungal agent for many years. Vincent et al. (2017) published a review on Cu antimicrobial properties. They mention a "contact killing" property of Cu, which can partially explain the low tolerance of some isolates in our study. According to this review, copper ions released by the culture medium cause cell alterations (more than DNA damages) and lead to cell death. The oxidative stress is also mentioned as an important consequence of Cu exposure, even amplified by the previous membrane damages. Membrane damages could occur here during Cu exposure, lead to cell death, and disrupt the biosorption process. Acclimatization of fungi under metal stress could partially preserve a Cu-tolerance and explain why some isolates collected from Cu-contaminated soils were more efficient in Cu biosorption.

Influence of soil origin

Several fungal isolates were able to tolerate and biosorb trace metal even if they came from a non-contaminated soil (like *Humicola* and *Chaetomium* with Cd or *Megacollybia platyphylla* with Pb). These results suggested that fungal species could tolerate and biosorb a toxic substance without a previous contact, as an intrinsic tolerance. It is also possible that another toxic substance or stress could have enhanced a nonspecific tolerance to Cd or Pb (Gube 2016).

However, fungal isolates, which came from a Cu-contaminated soil, could reveal a better biosorption percentage than isolates from a non-Cu-contaminated soil. Zotti et al. (2014) collected several fungal isolates from a Cu-contaminated area and tested their potential in Cu biosorption.

The strains *Trichoderma harzanium* and *Clonostachys rosea* were able to biosorb up to 20 mg g^{-1}, which seems higher than the 10 mg g^{-1} biosorbed in the present work by *Coprinellus micaceus, Chaetomium gracile, Ganoderma resinaceum,* and *Petriella sp.* These isolates came from a Cu-contaminated land (soils 3 and 4).

Six isolates collected from non-Cu-contaminated areas also showed comparable results in Cu accumulation: *Pleurotus ostreatus, Agaricus bisporus, Fomes fomentarius, Psathyrella candolleana, Xylaria sp,* and *Phaeophlebiopsis peniophoroides* that came from a soil contaminated by another pollutant (PCB). Despite the comparable Cu concentrations inside their mycelium, the biosorption percentages of isolates originating from Cu-contaminated soils were higher.

An acclimatization of the fungal isolates to a particular toxic metal (like Cu) could enhance the biosorption abilities, as shown by Zhang et al. (2016) and Li et al. (2017).

Influence of fungal taxonomy

Our results suggested that species belonging to the same genera could reveal different biosorption abilities like *Humicola sp* and *H. fuscoatra* with Cd and Cu, *Chaetomium gracile* and *C. atrobrunneum* with Cu, *Coprinellus xanthothrix* and *C. micaceus* with Pb. No link was found between the taxonomy of fungal isolates and their biosorption abilities, which was in agreement with a previous study (Trevors 1986). Nevertheless, different species in a same genus could reveal similar biosorption abilities. This was observed with the two *Coprinellus* in presence of Cd and Cu, and the two *Humicola* exposed to Pb. Our results also suggested that Basidiomycetes may biosorb more Pb than Ascomycetes. The concentration inside the mycelium was 18.3 µg mg^{-1} for the Basidiomycetes and 9.5 µg mg^{-1} for the Ascomycota although similar biomass production and biosorption percentages were observed.

The performances in Cd biosorption obtained by Li et al (2017) were lower than these obtained in the present work, even for the strain *Pleurotus ostreatus* they acclimatized in Cd-enriched

medium. Despite the improvement of the Cd intake and the removal rate, this acclimatized strain was not able to biosorb more Cd than this used by Favero (1991) or by our native forest isolate of *Pleurotus ostreatus*. These results highlighted the differences in biosorption abilities between isolates belonging to a same species.

Influence of fungal biomass

As we observed with *Absidia cylindrospora*, the growth capacity and biomass production constituted an important advantage to develop a bioremediation method. Indeed a great surface of mycelium could enhance sorption interactions between metals and chemical groups of the fungal cell wall, or fungal metabolites.

Several studies already showed the biosorption potential of *Pleurotus ostreatus*. Favero et al. (1991) revealed that this species was able to tolerate up to 150 mg L^{-1} and biosorb about 20 mg g^{-1} of Cd. These better performances, in comparison to the present work (20 mg L^{-1} and 5.3 mg g^{-1}) might be related to the longer duration of preculture. These conditions allowed a higher biomass production, which could enhance tolerance and biosorption processes. Vimala and Das (2011) showed that the biosorption of Cd by *Pleurotus platypus* involved membrane ion exchange, which was relevant with the significance of biomass.

Ganoderma lucidum (Basidiomycota) was studied by Matute et al. (2011). During the study, the authors noticed that a low Cu supplement in the growth media (50 to 100 mg kg^{-1}) could enhance biomass production. This particularity could be used in order to enhance biomass production by fungi.

Li et al. (2009) revealed the biosorption of Cu by dead fungal biomass (inactivated by formaldehyde) of *Bjerkandera sp* (12.1 mg g^{-1}), *Cladosporium cladosporioides* (7.7 mg g^{-1}), *Gliomastix murorum* (9.0 mg g^{-1}) but no information was given about the percentage of Cu-removal

by these strains. Nevertheless, the fact that dead fungal biomass could also be efficient in biosorption should be taken under consideration for further studies.

It appeared that nitrate could enhance oxalate and biomass production by fungi (Gadd 2008). Even if the use of $Pb(NO_3)_2$ in our experiment does not reduce significantly the pH, this particularity could partially explain why Pb is better biosorbed than Cd and Cu, at least by an increase in biomass production.

Selection of efficient isolates

Several isolates of the present study revealed promising bioremediation potential. Among the 28 fungi tested, *Absidia cylindrospora* biosorbed more than 45% of Cd and Pb, *Chaetomium atrobrunneum* biosorbed more than 45% of Cd, Cu, Pb, and *Coprinellus micaceus* biosorbed 100% of Pb. The strain *A. cylindrospora* has been previously described for its ability to degrade fluorene (Garon et al. 2004) and could be an interesting strain to treat multi-contaminated environments. *Irpex lacteus, Pleurotus ostreatus,* and *P. cornucopiae* are others species that could be efficient in the bioremediation of multi-contaminated environments (Novotny et al. 2009; Pozdnyakova et al. 2018; Li et al. 2017; Jiang et al. 2015).

Conclusions

This study presents the tolerance and biosorption abilities of several fungi isolated from industrial contaminated soils and natural forest soils. These fungal isolates revealed different tolerance and biosorption profiles. No relationship has been highlighted between the specific profiles and the taxonomic groups. Some isolates seemed metal specific, as *Coprinellus micaceus*, which can biosorb 100% of Pb. Some others could significantly biosorb more than one metal, for example, *Absidia cylindrospora* is able to biosorb Cd (45%) and Pb (65%), *Perenniporia fraxinea* was able to biosorb Cd (41%), Cu (35%), and Pb (46%) and *Chaetomium atrobrunneum* was able to biosorb more than 42% of Cd, Cu, and Pb. These strains could be used in further studies in order to improve their biomass production and biosorption levels. As mentioned in previous publications by Dey et al. (2016), Kothe and Büchel (2014), and Mishra and Malik (2014), the use of a consortium of microorganisms for their multi-metal biosorption abilities should be further investigated. In this way, fungi could be good candidates to address complex pollution.

Acknowledgments

We would like to acknowledge Mrs Margaret Dearing for improving the English of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Adamo P, Iavazzo P, Albanese S, Agrelli D, De Vivo B, Lima A.2014. Bioavailability and soil-to-plant transfer factors as indicators of potentially toxic element contamination in agricultural soils. Sci Total Environ 500–501:11–22.

Albert Q, Leleyter L, Lemoine M, Heutte N, Rioult J-P, Sage L, Baraud F, Garon D. 2018. Comparison of tolerance and biosorption of three trace metals (Cd, Cu, Pb) by the soil fungus *Absidia cylindrospora*. Chemosphere 196:386–392.

Ali A, Guo D, Mahar A, Wang P, Shen F, Li R, Zhang Z. 2017. Mycoremediation of Potentially Toxic Trace Elements—a Biological Tool for Soil Cleanup: A Review. Pedosphere 27:205–222.

An YJ. 2004. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. Environ Pollut 127:21–26.

Baldrian P. 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. Enzyme Microb Technol 32:78–91.

Baraud F, Leleyter L. 2012. Prediction of phytoavailability of trace metals to plants: Comparison between chemical extractions and soil-grown radish. Comptes Rendus Géosciences 344:385–395.

Bes CM, Jaunatre R, Mench M. 2013. Seed bank of Cu-contaminated topsoils at a wood preservation site: impacts of copper and compost on seed germination. Environ Monit Assess 185:2039–2053.

Bolan N, Kunhikrishnan A, Thangarajan R, Kumpiene J, Park J, Makino T, Kirkham MB, Scheckel K. 2014. Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – To mobilize or to immobilize? J Hazard Mater 266:141–166.

Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew

Bouchiat R, Veignie E, Grizard D, Soebert C, Vigier M, Rafin C. 2015. Desalination and Water Treatment Ability of filamentous fungi to degrade four emergent water priority pollutants Ability of filamentous fungi to degrade four emergent water priority pollutants. Desal Water Treat 1-7.

Bravin MN, Michaud AM, Larabi B, Hinsinger P. 2010. RHIZOtest: A plant-based biotest to account for rhizosphere processes when assessing copper bioavailability. Environ Pollut 158:3330–3337.

Ceci A, Rhee YJ, Kierans M, Hillier S, Pendlowski H, Gray N, Persiani AM, Gadd GM. 2015. Transformation of vanadinite [Pb5 (VO4)3 Cl] by fungi. Environ Microbiol 17:2018–2034.

Chatterjee S, Sarma MK, Deb U, Steinhauser G, Walther C, Gupta DK. 2017. Mushrooms: from nutrition to mycoremediation. Environ Sci Pollut Res 24:19480–19493.

Chen C, Lei W, Lu M, Zhang J, Zhang Z, Luo C, Chen Y, Hong Q, Shen Z. 2016. Characterization of Cu(II) and Cd(II) resistance mechanisms in *Sphingobium sp* PHE-SPH and *Ochrobactrum sp* PHE-OCH and their potential application in the bioremediation of heavy metal-phenanthrene co-contaminated sites. Environ Sci Pollut Res 23:6861–6872.

Chen A, Shang C, Zeng G, Chen G, Shao J, Zhang J, Huang H. 2015. Extracellular secretions of *Phanerochaete chrysosporium* on Cd toxicity. Int Biodeterior Biodegrad 105:73–79.

Courtecuisse R, Duhem B. 2013. Champignons de France et d'Europe. Delachaux et Niestlé, Paris

Crane S, Dighton J, Barkay T. 2010. Growth responses to and accumulation of mercury by ectomycorrhizal fungi. Fungal Biol 114:873–880.

Danesh YR, Tajbakhsh M, Goltapeh EM, Varma A. 2013. Mycoremediation of Heavy Metals. In: Goltapeh EM, Danesh YR, Varma A (eds) Fungi as Bioremediators. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 245–267

Deng Z, Cao L, Huang H, Jiang X, Wang W, Shi Y, Zhang R. 2011. Characterization of Cd- and Pb-resistant fungal endophyte *Mucor sp* CBRF59 isolated from rapes (*Brassica chinensis*) in a metal-contaminated soil. J Hazard Mater 185:717–724.

Dey P, Gola D, Mishra A, Malik A, Kumar P, Singh DK, Patel N, von Bergen M, Jehmlich N. 2016. Comparative performance evaluation of multi-metal resistant fungal strains for simultaneous removal of multiple hazardous metals. J Hazard Mater 318:679–685.

Domsch KH. 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press, London, New York

Favero N, Costa P, Massimino ML. 1991. In vitro uptake of cadmium by basidiomycetes *Pleurotus ostreatus*. Biotechnol Lett 13:701–704.

Fomina M, Burford EP, Hillier S, Kierans M, Gadd GM. 2010.. Rock-Building Fungi. Geomicrobiol J 27, 624–629.

Fomina M, Gadd GM. 2014. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. Bioresour Technol 160:3–14.

Fomina M, Ritz K, Gadd GM. 2003. Nutritional influence on the ability of fungal mycelia to penetrate toxic metal-containing domains. Mycol Res 107:861-871.

Gadd GM. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. Mycol Res 111:3-49.

Gadd GM. 2008. Fungi and Their Role in the Biosphere – Jørgensen SE, Fath B. In: Encyclopedia of Ecology. Academic Press, Oxford, pp 1709–1717

Gadd GM (2017) Heavy Metal Pollutants: Environmental and Biotechnological Aspects. In: Reference Module in Life Sciences. Elsevier

Gadd GM, Bahri-Esfahani J, Li Q, Rhee YJ, Wei Z, Fomina M, Liang X. 2014. Oxalate production by fungi: significance in geomycology, biodeterioration and bioremediation. Fungal Biol Rev 28:36–55.

García MA, Alonso J, Melgar MJ. 2009. Lead in edible mushrooms: Levels and bioaccumulation factors. J Hazard Mater 167:777–783.

García-Delgado C, Jiménez-Ayuso N, Frutos I, Gárate A, Eymar E. 2013. Cadmium and lead bioavailability and their effects on polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation by spent mushroom substrate. Environ Sci Pollut Res 20:8690–8699.

Garon D, Sage L, Wouessidjewe D, Seigle-Murandi F. 2004. Enhanced degradation of fluorene in soil slurry by *Absidia cylindrospora* and maltosyl-cyclodextrin. Chemosphere 56:159–166.

Glasauer SM, Beveridge TJ, Burford EP, Harper FA, Gadd GM. 2013. Metals and Metalloids, Transformation by Microorganisms. In: Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Elsevier

Goltapeh EM, Danesh YR, Varma A (eds). 2013. Fungi as Bioremediators. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg

Gube M. 2016. Fungal Molecular Response to Heavy Metal Stress. In: Biochemistry and Molecular Biology. Springer, Cham, pp 47–68

Hamdoun H, Van-Veen E, Basset B, Lemoine M, Coggan J, Leleyter L, Baraud F. 2015. Characterization of harbor sediments from the English Channel: assessment of heavy metal enrichment, biological effect and mobility. Mar Pollut Bull 90:273–280.

Jaeckel P, Krauss G, Menge S, Schierhorn A, Rücknagel P, Krauss GJ. 2005. Cadmium induces a novel metallothionein and phytochelatin 2 in an aquatic fungus. Biochem Biophys Res Commun 333:150–155.

Jiang J, Liu H, Li Q, Gao N, Yao Y, Xu H. 2015. Combined remediation of Cd–phenanthrene co-contaminated soil by *Pleurotus cornucopiae* and *Bacillus thuringiensis* FQ1 and the antioxidant responses in *Pleurotus cornucopiae*. Ecotoxicol Environ Saf 120:386–393.

Kothe E, Büchel G. 2014. UMBRELLA: Using MicroBes for the REgulation of heavy metaL mobiLity at ecosystem and landscape scAle. Environ Sci Pollut Res 21:6761-6764.

Kumari D, Qian XY, Pan X, Achal V, Li Q, Gadd GM. 2016. Microbially-induced Carbonate Precipitation for Immobilization of Toxic Metals, in: Advances in Applied Microbiology. Elsevier, pp. 79–108.

Kurniati E, Arfarita N, Imai T, Higuchi T, Kanno A, Yamamoto K, Sekine M. 2014. Potential bioremediation of mercury-contaminated substrate using filamentous fungi isolated from forest soil. J Environ Sci 26:1223–1231.

Li X, Peng W, Jia Y, Lu L, Fan W. 2016. Bioremediation of lead contaminated soil with *Rhodobacter sphaeroides*. Chemosphere 156:228–235.

Li Q, Wu S, Liu G, Liao X, Deng X, Sun D, Hu Y, Huang Y. 2004. Simultaneous biosorption of cadmium (II) and lead (II) ions by pretreated biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. Sep Purif Technol 34:135–142.

Li X, Wang Y, Pan Y, Yu H, Shen X, Jiao X, Wu Y, La S, Yuan K, Zhang G. 2017. Mechanisms of Cd and Cr removal and tolerance by macrofungus *Pleurotus ostreatus* HAU-2. J Hazard Mater 330:1–8.

Li X, Xu Q, Han G, Zhu W, Chen Z, He X, Tian X. 2009. Equilibrium and kinetic studies of copper(II) removal by three species of dead fungal biomasses. J Hazard Mater 165:469–474.

Liu SH, Zeng GM, Niu QY, Liu Y, Zhou L, Jiang LH, Tan X, Xu P, Zhang C, Cheng M. 2017. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review. Bioresour Technol 224:25–33.

Mao L, Tang D, Feng H, Gao Y, Zhou P, Xu L, Wang L. 2015. Determining soil enzyme activities for the assessment of fungi and citric acid-assisted phytoextraction under cadmium and lead contamination. Environ Sci Pollut Res 22:19860–19869.

Marchand C, St-Arnaud M, Hogland W, Bell T, Hijri M. 2017. Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. Int Biodeter Biodegrad 116:48-57.

Marques CR. 2016. Bio-rescue of marine environments: On the track of microbially-based metal/metalloid remediation. Sci Total Environ 565:165–180.

Martino E, Perotto S. 2010. Mineral Transformations by Mycorrhizal Fungi. Geomicrobiology Journal 27, 609–623.

Matute RG, Serra A, Figlas D, Curvetto N. 2011. Copper and Zinc Bioaccumulation and Bioavailability of *Ganoderma lucidum*. J Med Food 14:1273–1279.

Miersch J, Tschimedbalshir M, Bärlocher F, Grams Y, Pierau B, Schierhorn A, Krauss GJ. 2001. Heavy metals and thiol compounds in *Mucor racemosus* and *Articulospora tetracladia*. Mycol Res 105:883–889.

Mishra A, Malik A. 2014. Novel fungal consortium for bioremediation of metals and dyes from mixed waste stream. Bioresour Technol 171:217–226.

Narendrula-Kotha R, Nkongolo KK. 2017. Bacterial and fungal community structure and diversity in a mining region under long-term metal exposure revealed by metagenomics sequencing. Ecol Genet Genomics 2:13–24.

NCBI BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Accessed 11 Aug 2017

Nongmaithem N, Roy A, Bhattacharya PM. 2016. Screening of *Trichoderma* isolates for their potential of biosorption of nickel and cadmium. Braz J Microbiol 47:305–313.

Novotný C, Cajthaml T, Svobodová K, Susla M, Sasek V. 2009. *Irpex lacteus*, a white-rot fungus with biotechnological potential--review. Folia Microbiol (Praha) 54:375–390.

Pozdnyakova N, Dubrovskaya E, Chernyshova M, Makarov O, Golubev S, Balandina S, Turkovskaya O. 2018. The degradation of three-ringed polycyclic aromatic hydrocarbons by wood-inhabiting fungus *Pleurotus ostreatus* and soil-inhabiting fungus *Agaricus bisporus*. Fungal Biology 122:363–372 .

Rafin C, Potin O, Veignie E, Lounès Hadj-Sahraoui A, Sancholle M. 2000. Degradation of benzo[a]pyrene as sole carbon source by a non white-rot fungus *Fusarium solani*. Polycyclic Aromatic Comp 21:311-329.

Rhee YJ, Hillier S, Gadd GM. 2012. Lead Transformation to Pyromorphite by Fungi. Curr Biol 22:237–241.

Robert V, Vu D, Amor ABH, van de Wiele N, Brouwer C, Jabas B, Szoke S, Dridi A, Triki M, Daoud SB, et al. 2013. MycoBank gearing up for new horizons. IMA Fungus 4:371–379.

Saxena P, Bhattacharyya AK, Mathur N. 2006. Nickel Tolerance and Accumulation by Filamentous Fungi From Sludge of Metal Finishing Industry. Geomicrobiol J 23, 333–340.

Sazanova K, Osmolovskaya N, Schiparev S, Yakkonen K, Kuchaeva L, Vlasov D. 2015. Organic acids induce tolerance to zinc- and copper-exposed fungi under various growth conditions. Curr Microbiol 70:520–527.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Bolchacova E, Voigt K, Crous PW, et al. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proc Natl Acad Sci 109:6241–6246.

Singh H. 2006. Mycoremediation: Fungal Bioremediation. Wiley/Interscience, Hoboken, NJ

Singh JS. 2015. Microbes: The chief ecological engineers in reinstating equilibrium in degraded ecosystems. Agric Ecosyst Environ 203:80–82.

Soares E, Soares HVM. 2013. Cleanup of industrial effluents containing heavy metals: a new opportunity of valorising the biomass produced by brewing industry. Appl Microbiol Biotechnol 97:6667–6675.

Sterflinger K. 2000. Fungi as Geologic Agents. Geomicrobiol J 17, 97–124.

Stolte J, Tesfai M, Øygarden L, Kværnø S, Keizer J, Verheijen F, Panagos P, Ballabio C, Hessel R, European Commission, Joint Research Centre, Institute for Environment and Sustainability. 2015. Soil threats in Europe. Publications Office, Luxembourg

Sun L, Cao X, Li M, Zhang X, Li X, Cui Z. 2017. Enhanced bioremediation of lead-contaminated soil by *Solanum nigrum* L. with *Mucor circinelloides*. Environ Sci Pollut Res 24:9681–9689.

Toju H, Tanabe AS, Yamamoto S, Sato H. 2012. High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. PloS One 7(7): e40863.

Trevors JT, Stratton GW, Gadd GM. 1986. Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. Can J Microbiol 32:447–464.

Ullah A, Heng S, Munis MF, Fahad S, Yang X. 2015. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. Environ Exp Bot 117:28–40.

Velmurugan N, Hwang G, Sathishkumar M, Choi TK, Lee K-J, Oh BT, Lee Y-S. 2010. Isolation, identification, Pb(II) biosorption isotherms and kinetics of a lead adsorbing *Penicillium* sp. MRF-1 from South Korean mine soil. J Environ Sci 22:1049–1056.

Vimala R, Das N. 2011. Mechanism of Cd(II) adsorption by macrofungus *Pleurotus platypus*. J Environ Sci 23:288–293.

Vincent M, Duval R, Hartemann P, Engels-Deutsch M. 2017. Contact killing and antimicrobial properties of copper. J Appl Microbiol.

Warcup JH. 1950. The Soil-Plate Method for Isolation of Fungi from Soil. Nature 166:117–118.

Xu J, Bravo AG, Lagerkvist A, Bertilsson S, Sjöblom R, Kumpiene J. 2015. Sources and remediation techniques for mercury contaminated soil. Environ Int 74:42–53.

Young SD. 2013. Chemistry of Heavy Metals and Metalloids in Soils, in: Heavy Metals in Soils, Environmental Pollution. Springer, Dordrecht, pp. 51–95.

Zhang S, Zhang X, Chang C, Yuan Z, Wang T, Zhao Y, Yang X, Zhang Y, La G, Wu K, et al. 2016. Improvement of tolerance to lead by filamentous fungus *Pleurotus ostreatus* HAU-2 and its oxidative responses. Chemosphere 150:33–39.

Zotti M, Di Piazza S, Roccotiello E, Lucchetti G, Mariotti MG, Marescotti P. 2014. Microfungi in highly copper-contaminated soils from an abandoned Fe–Cu sulphide mine: Growth responses, tolerance and bioaccumulation. Chemosphere 117:471–476.

Table 1. Description of the fungal isolates

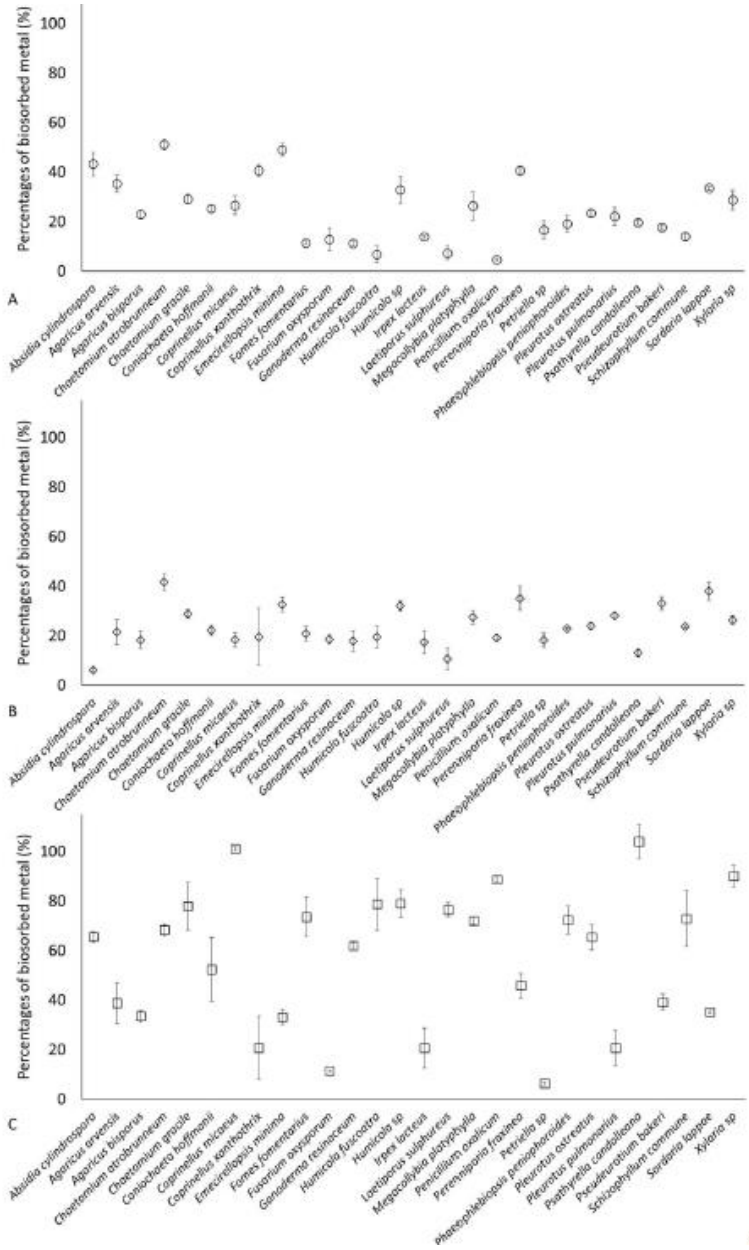
Soil origin of the fungal isolates	Division Order[a]	Family[a]	Species	Culture Medium[b]	Subculture duration (days)
Soil 1: Industrial	Mucoromycota	*Cunninghamellaceae*	***Absidia cylindrospora***	MEA	10
Soil 2: Forest Cd = 1.4 mg kg^{-1} Cu = 7 mg kg^{-1} Pb = 3.9 mg kg^{-1}	Basidiomycota Agaricales	*Agaricaceae*	***Agaricus arvensis***	PDA	20
		Agaricaceae	***Agaricus bisporus***	PDA	20
		Marasmiaceae	***Megacollybia platyphylla***	MEA	20
		Pleurotaceae	***Pleurotus ostreatus***	MEA	10
		Pleurotaceae	***Pleurotus pulmonarius***	MEA	10
	Basidiomycota Polyporales	*Polyporaceae*	***Fomes fomentarius***	MEA	10
		Fomitopsidaceae	***Laetiporus sulphureus***	MEA	10
	Basidiomycota	*Psathyrellaceae*	***Coprinellus xanthothrix***	MEA	10
Soil 3: Industrial Cd < DL[c] Cu 345 mg kg^{-1} Pb 160 mg kg^{-1}	Ascomycota Sordariales	*Chaetomiaceae*	***Chaetomium atrobrunneum***	MEA	20
		Chaetomiaceae	***Chaetomium gracile***	MEA	20
		Chaetomiaceae	***Humicola fuscoatra***	MEA	20
		Sordariaceae	***Sordaria lappae***	MEA	10
Soil 4: Industrial Cd < DL[c] Cu 100 mg kg^{-1} Pb 140 mg kg^{-1}	Basidiomycota	*Psathyrellaceae*	***Coprinellus micaceus***	MEA	10
	Ascomycota	*Trichocomaceae*	***Penicillium oxalicum***	MEA	20
	Ascomycota	Not assigned	***Emericellopsis minima***	PDA	20
	Ascomycota	*Microascaceae*	***Petriella sp***	MEA	20
	Basidiomycota Polyporales	*Ganodermataceae*	***Ganoderma resinaceum***	MEA	10
		Polyporaceae	***Perenniporia fraxinea***	PDA	20
	Ascomycota	*Chaetomiaceae*	***Humicola sp***	MEA	10
	Ascomycota	*Pseudeurotiaceae*	***Pseudeurotium bakeri***	MEA	20
	Basidiomycota Agaricales	*Psathyrellaceae*	***Psathyrella candolleana***	MEA	10
		Schizophyllaceae	***Schizophyllum commune***	MEA	10
Soil 5: Industrial PCB > 8000 mg kg^{-1}	Basidiomycota Polyporales	*Phanerochaetaceae*	***Irpex lacteus***	MEA	10
		Not assigned	***Phaeophlebiopsis peniophoroides***	MEA	10
	Ascomycota	*Xylariaceae*	***Xylaria sp***	MEA	20
Soil 6: Industrial Cu 2 mM	Ascomycota	*Coniochaetaceae*	***Coniochaeta hoffmannii***	MEA	20
	Ascomycota	*Nectriaceae*	***Fusarium oxysporum***	PDA	10

[a] Source: Mycobank
[b] MEA: Malt Extract Agar; PDA: Potato Dextrose Agar
[c] DL: Detection limit (0.0005 mg L^{-1} for Cd, 0.03 mg L^{-1} for Cu, and 0.03 mg L^{-1} for Pb)

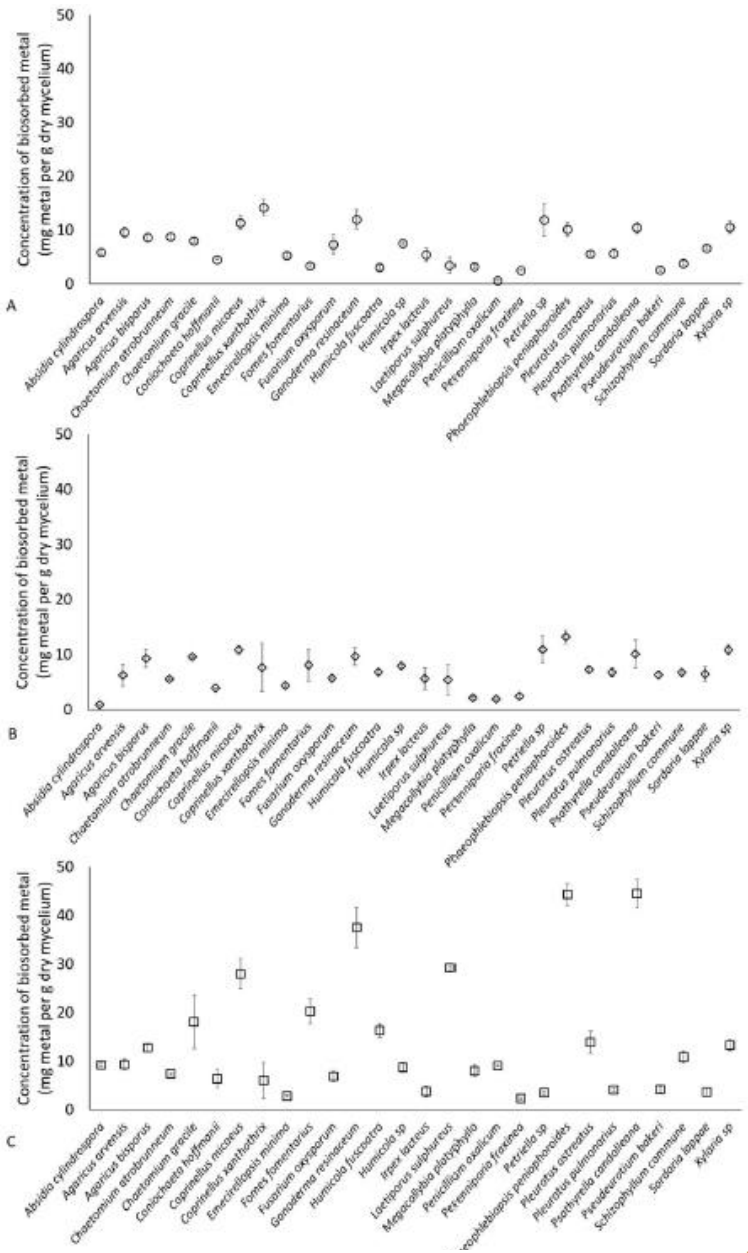
Table 2. Tolerance, pH variations and biomass production after exposure at 50 mg L^{-1} of metal during 3 days.

Soils	Isolates	Cd 50 mg L^{-1} 3 days			Cu 50 mg L^{-1} 3 days			Pb 50 mg L^{-1} 3 days		
		HTC[a]	ΔpH[b]	BP[c]	HTC	ΔpH	BP	HTC	ΔpH	BP
1	***Absidia cylindrospora***	**1000**	+0.2	92	50	+0.1	91	10	+0.4	90
2	***Agaricus arvensis***	100	-0.2	66	100	-0.4	67	**1000**	-0.2	74
	Agaricus bisporus	100	-0.1	75	100	-0.9	59	**1000**	-0.3	75
	Fomes fomentarius	50	+0.6	64	50	-0.4	61	100	+0.7	70
	Laetiporus sulphureus	10	+0.3	98	100	-0.1	99	**1000**	-0.1	111
	Megacollybia platyphylla	0	+0.1	64	10	-0.3	103	100	+0.1	73
	Pleurotus ostreatus	10	0	72	10	**-1.2**	57	10	-0.3	82
	Pleurotus pulmonarius	10	**+1.8**	84	50	**+1.1**	90	10	+0.8	105
3	***Chaetomium atrobrunneum***	100	**+1**	61	10	0	79	100	-0.3	98
	Chaetomium gracile	100	+0.3	74	50	-0.2	61	10	-0.2	93
	Coprinellus xanthothrix	100	-0.1	57	10	**-1.1**	49	100	+0.2	70
	Humicola fuscoatra	100	+0.3	64	100	-0.4	76	**1000**	**+1.1**	126
	Sordaria lappae	100	-0.2	47	10	-0.7	57	100	0	95
4	***Coprinellus micaceus***	100	**+1.4**	68	10	**+1.1**	90	100	+0.8	105
	Emericellopsis minima	100	-0.1	80	100	**-1.1**	64	100	0.1	102
	Ganoderma resinaceum	100	**+1.1**	40	50	+0.1	78	100	-0.1	70
	Humicola sp	100	-0.5	47	100	-0.8	43	100	+0.1	99
	Penicillium oxalicum	50	-0.1	64	100	-0.2	91	**1000**	0	87
	Perenniporia fraxinea	10	0	70	100	0	63	**1000**	0	87
	Petriella sp	100	+0.1	93	10	-0.6	106	100	+0.4	116
5	***Pseudeurotium bakeri***	100	+0.3	67	100	-0.8	52	100	+0.3	93
	Irpex lacteus	50	-0.1	62	10	-0.1	77	**1000**	0	120
	Phaeophlebiopsis peniophoroides	50	-0.3	75	100	-0.4	70	100	-0.1	66
	Psathyrella candolleana	100	+0.2	94	10	-0.4	65	100	+0.2	114
	Schizophyllum commune	50	-0.3	54	50	-0.4	52	100	-0.1	100
	Xylaria sp	100	+0.3	36	100	-0.4	33	50	0	92
6	***Coniochaeta hoffmannii***	100	-0.3	88	100	**-1.2**	89	**1000**	-0.3	130
	Fusarium oxysporum	100	-0.4	49	**1000**	-0.7	82	**1000**	-0.4	43

[a] HTC (mg L^{-1}): Highest Tolerated Concentration of metal that allowed fungal growth
[b] ΔpH: variation of pH in the medium after metal exposure
[c] BP: Biomass Production as a percentage of the control in the same conditions



605 **Figure 1.** Percentages of biosorbed metals after 3 days of exposure at 50 mg L^{-1} of Cd (A), Cu
606 (B), and Pb (C).



607 **Figure 2.** Concentrations of biosorbed metals after 3 days of exposure at 50 mg L^{-1} of Cd (A),
608 Cu (B), and Pb (C).

SELECTION DE SOUCHES FONGIQUES PERFORMANTES DANS LA BIOSORPTION DE 3 ELEMENTS TRACES METALLIQUES (Cd, Cu ET Pb) ET ETUDE DE LEUR SPECIATION MINERALOGIQUE EN MICROCOSME DE SOL.

Les contaminations des sols par les éléments traces métalliques constituent la deuxième contamination la plus importante au niveau mondial avec plus de 5 millions de sites contaminés répertoriés. Cette contamination est devenue globale et diffuse au sein des écosystèmes et présente des risques non négligeables pour l'environnement, l'économie agricole et la santé publique. Cd, Cu et Pb sont parmi les métaux les plus représentés et/ou les plus à risque de cette contamination. Les comportements difficilement prévisibles des métaux au sein de la matrice sol complexifient les stratégies de remédiation. Les méthodes biologiques représentent une alternative économique, écologique et efficace. Le potentiel des champignons est de plus en plus étudié dans ce domaine.

Notre travail propose de mesurer la tolérance et les capacités de biosorption de 28 isolats fongiques issus de sols contaminés et de sélectionner les isolats les plus efficaces pour des essais en microcosmes de sols contaminés. Ainsi, 3 isolats ont été sélectionnés. *Absidia cylindrospora* tolère 1000 $mg.L^{-1}$ de Cd en milieu gélosé et biosorbe plus de 50% de Cd et Pb en milieu liquide après 3 jours d'exposition. *Coprinellus micaceus* biosorbe 100% de Pb en milieu liquide. Enfin, *Chaetomium atrobrunneum* biosorbe plus de 50% de ces 3 métaux en milieu liquide, après 3 jours d'exposition.

Les essais en microcosmes de sols révèlent que les capacités de colonisation de la matrice par l'isolat fongique sont essentielles afin d'avoir une influence significative sur la fraction potentiellement mobile des métaux. Ainsi, *A. cylindrospora* montre le meilleur potentiel des isolats testés en bioaugmentation. Au bout de 20 jours de traitement, cette espèce est capable de diminuer la fraction potentiellement disponible de Cd de 5% et de Cu de 7%. Des essais complémentaires semblent nécessaires afin d'améliorer le processus (traitement plus long avec un apport de biomasse fongique plus important) et de mieux comprendre les transferts d'ETM au sein du sol en présence de champignons.

SELECTION OF EFFICIENT FUNGAL STRAINS FOR THE BIOSORPTION OF Cd, Cu, AND Pb AND STUDY OF THEIR MINERALOGICAL SPECIATION IN SOIL MICROCOSMS

Soil contaminations by trace metals are the second most frequent contamination in the world, counting more than 5 million polluted sites. This contamination represents a risk for the environment, the economy, the agriculture and the public health. Cd, Cu, and Pb are among the most frequent and/or toxic elements of this contamination. The hardly predictable behavior of trace metals in the soil matrix turn the remediation methods into a complex issue. Biological methods could be an economic, eco-friendly, and efficient alternative. The potential of the Fungi is more and more studied in this field.

Our work aim is to evaluate the tolerance and the biosorption abilities of 28 fungi isolated from polluted soils, and to select the most efficient ones to perform microcosm's experiments of polluted soils. Thus, 3 fungal isolates have been selected. *Absidia cylindrospora* tolerates 1000 $mg.L^{-1}$ in agar medium and biosorbs more than 50% of Cd and Pb after 3 days in liquid medium. *Coprinellus micaceus* biosorbs 100% of Pb in liquid medium. Finally, *Chaetomium atrobrunneum* biosorbs more than 50% of each metals after 3 days of exposure in liquid medium.

The microcosm's experiments reveal that the colonization abilities of the isolates is crucial to enhance the influence of the fungal development on the potentially mobile metal fraction. Thus, *A. cylindrospora* shows the best potential among the tested isolates in bioaugmented microcosms in order to decrease the potentially mobile fraction of the metals. After 20 days, this isolate decrease the potentially mobile fraction of Cd and Cu respectively by 5 and 7%. Complementary experiments are needed to improve the process (longer experiment, higher fungal biomass) and to better understand the transfers of the metals in presence of fungal organisms.