



HAL
open science

**Étude des mécanismes intervenant dans la
biodégradation des hydrocarbures aromatiques
polycycliques par les champignons saprotrophes
telluriques en vue d'applications en bioremédiation
fongique de sols pollués**

Antoine Fayeulle

► **To cite this version:**

Antoine Fayeulle. Étude des mécanismes intervenant dans la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques par les champignons saprotrophes telluriques en vue d'applications en bioremédiation fongique de sols pollués. Biotechnologies. Université du Littoral Côte d'Opale; Technische Universität (Munich, Allemagne), 2013. Français. NNT : 2013DUNK0351 . tel-01296488

HAL Id: tel-01296488

<https://theses.hal.science/tel-01296488v1>

Submitted on 1 Apr 2016

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

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

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale 104
Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement
Filière Ingénierie des Fonctions Biologiques

Etude des mécanismes intervenant dans la biodégradation des
Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques par les champignons
saprotrophes telluriques en vue d'applications en
bioremédiation fongique de sols pollués

Présentée par

Antoine FAYEULLE

Soutenance le 12 Décembre 2013 devant la commission d'examen

M. SIGOILLOT Jean-Claude, Professeur, Université d'Aix-Marseille, France	Rapporteur
M. DURAN Robert, Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour, France	Rapporteur
Mme PRITSCH Karin, Privatdozentin Université, TUM, Allemagne	Examinatrice
M. TELLIER Aurélien, Professeur, TUM, Allemagne	Examineur
Mme RAFIN Catherine, Maître de Conférences-HDR, ULCO, France	Co-Directrice
M. MUNCH Jean Charles, Professeur, TUM, Allemagne	Co-Directeur

*Je dédie ce mémoire à mon grand-père
Marcel Fayeulle (1922-2012)*

"In the end, our society will be defined not only by what we
create, but by what we refuse to destroy"

John C. Sawhill

Remerciements

Ce travail de thèse ne serait pas ce qu'il est sans la participation et le soutien de différentes personnes que je souhaite remercier.

Je tiens à exprimer mon entière gratitude à Mr. le Professeur R. Duran et Mr. le Professeur J. C. Sigoillot d'avoir accepté de juger ce travail de thèse et d'en être les rapporteurs. Je remercie également Mme Dr. K. Pritsch et Mr. le Professeur A. Tellier d'avoir accepté d'être examinateurs.

Je remercie mes co-directeurs de thèse Dr. C. Rafin (équipe IPCR "Interactions Plantes-Champignons et Remédiation, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant EA 4492, Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque) et Pr. Dr. J. C. Munch (directeur de l'Institut d'Ecologie des Sols IBÖ, Helmholtz Zentrum, Munich) de m'avoir permis de réaliser cette thèse en cotutelle franco-allemande (Université du Littoral Côte d'Opale - Technische Universität München) dans de bonnes conditions et pour leur implication dans le suivi de ce travail de recherche. Il était en effet important pour moi de pouvoir continuer ma formation scientifique dans les deux pays dont mes parents sont originaires. Je suis également extrêmement reconnaissant à l'égard de mes encadrants scientifiques Dr. E. Veignie (IPCR, UCEIV, ULCO, Dunkerque), Dr. K. Pritsch (responsable du groupe Plant Soil System Ecology/Mycology, IBÖ, Helmholtz Zentrum, Munich) et Dr. R. Schroll (responsable du groupe Interactions between organic xenobiotics and soil-plants systems, IBÖ, Helmholtz Zentrum, Munich) pour leurs conseils pratiques concernant la réalisation des expériences.

Je remercie à titre posthume Mr. le Professeur P. Shirali, directeur de l'UCEIV décédé le 06/08/2013, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je remercie également Pr. Dr. D. Courcot qui assure actuellement l'administration provisoire de l'UCEIV. Je veux remercier aussi Mr. Le Professeur P. Reignault, responsable de l'équipe IPCR à laquelle je suis rattaché côté français.

Je tiens à remercier mes co-financeurs l'ADEME et la région Nord-Pas-de-Calais pour avoir soutenu ce projet scientifique. Un comité de pilotage annuel a été organisé dans le cadre de ce contrat de financement pour le suivi de l'avancement du programme de thèse et je souhaite en remercier les différents membres: Dr. F. Cadière (ingénieur ADEME, Service

Friches Urbaines et Sites Pollués), Mme C. Bugner (chargée de mission référent, Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais), Dr. C. Alary (coordinatrice du Groupement d'Intérêt Scientifique Sites, Sols et Sédiments Pollués GIS3SP), Mme F. Terki (ingénieur chez Lille Métropole Communauté Urbaine LMCU), Pr. Dr. J. C. Munch, Dr. C. Rafin et Dr. E. Veignie. Ce travail binational a bénéficié de l'aide au déplacement du Partenariat Huber Curien PROCOPE délivrée en 2012 et 2013 par le ministère des affaires étrangères et le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche que je remercie.

Je remercie les différents acteurs du site de l'Union près de Roubaix (Nord-Pas-De-Calais) pour nous avoir permis d'échantillonner sur ce site (le GIS3SP, la SEM Ville Renouvelée, l'Etablissement Public Foncier, Envisan, Burgeap et Geosan), ainsi que la SNCF qui nous a fourni un échantillon de sol du site de Moulin Neuf près de Chambly (Picardie).

Je veux remercier également les personnes qui ont pris part à l'avancement de ces travaux. Je pense notamment à Mr. Dr. C. Slomianny et Mr. E. Dewailly de l'équipe INSERM Physiologie Cellulaire U1003 (Lille), au personnel du Centre Commun de Mesure de Dunkerque (direction: Dr. F. Cazier), à Mme Dr. I. Sadovskaya (IE HDR, LR2B, ULCO, Boulogne-sur-Mer), à Mme Dr. U. Dörfler (groupe Interactions between organic xenobiotics and soil-plants systems, IBÖ, Helmholtz Zentrum, Munich) et à Mme Dr. L. Lyubenova (groupe Microbe-Plant Interactions, Abteilung Mikrogen-Pflanzen Interaktionen AMP, Helmholtz Zentrum, Munich). Je remercie également Dr. G. Welzl (Helmholtz Zentrum, Munich) pour ses conseils en traitements statistiques.

Je n'oublie pas de remercier mes collègues qui m'ont permis de travailler dans une ambiance agréable durant ces trois années aussi bien en France (Ana-Maria, Anca, Mary, Isabelle, Eléonore, Pierre-Edouard, Amadou, Tarek, Sohayb, Miriana, Mina, Axel, Romain et Rémi) qu'en Allemagne (Natalie, Laura, Nina, Patrick, Xiao Min, Hanyin, Renyi, Philipp, Fabian, René, Xenia et Lyudmila).

Enfin je tiens à remercier ma famille et tous mes amis pour leur soutien moral durant ces années d'étude.

Résumé

Des données récentes révèlent que l'Europe compterait 342 000 sites contaminés et plus de 2,5 millions de sites potentiellement contaminés. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) y représentent 11 % des contaminants des sols avec potentiellement des conséquences à long terme sur l'Homme et les écosystèmes. Cette thèse repose ainsi sur l'étude des champignons saprotrophes telluriques pour le développement de protocoles de bioremédiation des HAP dans les sols.

Une collection de 30 souches fongiques est constituée à partir d'échantillons de sols pollués historiquement aux HAP et provenant de 4 sites différents du Nord de la France (dont 2 provenant du site de l'Union à Roubaix). Ces souches sont caractérisées pour leurs capacités de désorption et de dégradation du Benzo[a]pyrène (BaP) en milieu minéral. Quatre souches (*Penicillium canescens*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani* et *Talaromyces helicus*) présentent des taux de dégradation du BaP supérieurs à 30 % après 9 jours d'incubation en milieu minéral dans les conditions expérimentales utilisées.

Des corrélations entre les taux de dégradation du BaP et des activités enzymatiques décrites comme impliquées dans la dégradation des HAP (lignine-/manganèse-peroxydase, laccase, époxydase du cytochrome P450 et dioxygénases) ou dans le processus de stress oxydant (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, glucose-6-phosphate déshydrogénase et catalase) sont alors recherchées sur un panel de 14 souches. Des concordances intéressantes entre les capacités de dégradation du BaP et des activités enzymatiques extracellulaires (Ln/Mn POX, laccase) ou liées au cytochrome P450 (époxydase) sont ainsi observées. Trois souches sélectionnées d'après leurs capacités de biodégradation du BaP et leurs activités enzymatiques (*C. cladosporioides*, *F. solani* et *T. helicus*) sont utilisées pour des essais au laboratoire de bioaugmentation/biostimulation en microsomes de sols historiquement contaminés en HAP. Le meilleur résultat est une augmentation d'environ 25 % de la dégradation des HAP totaux par rapport aux témoins suite à l'inoculation de la souche *T. helicus* dans deux sols d'origines et de textures différentes.

Le processus d'incorporation du BaP, un HAP à 5 cycles aromatiques, est étudié en microscopie chez la souche *F. solani*. Notre étude montre ainsi pour la première fois à notre connaissance que cette molécule serait incorporée dans les cellules fongiques par un processus actif dépendant du réseau d'actine du cytosquelette.

Ce travail de thèse ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour la compréhension des mécanismes de dégradation des HAP par les champignons saprotrophes telluriques et le développement de nouveaux protocoles de bioremédiation des sols.

Mots clés : Biodégradation, bioremédiation, Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, champignons saprotrophes, sol

Zusammenfassung

Neue Daten zeigen, dass Europa 342 000 Standorte und mehr als 2.5 Millionen potenziell kontaminierte Standorte zählen soll. Die Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) stellen 11 % von Bodenschadstoffen mit potenziellen Spätschäden auf die Menschheit und die Ökosysteme dar. So gründet diese Doktorarbeit im Kontext der Bioremediation von kontaminierten Böden auf dem Studium der saprotrophen Bodenpilze. Das Ziel ist, Protokolle des Abbaus von Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in Böden zu entwickeln.

Eine Sammlung von 30 Pilzstämmen wurde aus Bodenproben von 4 verschiedenen Orten in Nordfrankreich (darunter 2 Proben vom Industriestandort der „Union“ in Roubaix) erstellt, die seit längerer Zeit mit PAKs kontaminiert sind. Diese Pilzstämmen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, Benzo[a]pyren (BaP) in Mineral-Medium zu desorbieren und abzubauen. Vier Stämme (*Penicillium canescens*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani* und *Talaromyces helicus*) weisen nach 9-tägiger Inkubationszeit in Mineral-Medium Abbauraten von über 30 % unter den angewandten experimentellen Bedingungen auf.

Danach wurden für 14 ausgewählte Stämme Korrelationen zwischen den Abbauraten des BaP und den enzymatischen Aktivitäten ermittelt, welche in Zusammenhang mit dem Abbau von PAK (Lignin-/Mangan-Peroxidasen, Laccase, Epoxidase von Cytochrome P450 und Dioxigenasen) oder mit oxidativem Stress (Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Katalase) beschrieben wurden. So konnten interessante Übereinstimmungen zwischen den Abbaufähigkeiten der BaP und den extrazellulären (Ln/Mn POX, Laccase) oder mit Cytochrome P450 verbundenen (Epoxidase) Enzymaktivitäten beobachtet werden. Drei nach ihrer Abbaufähigkeit des BaP und nach ihren enzymatischen Aktivitäten ausgewählte Stämme (*C. cladosporioides*, *F. solani* und *T. helicus*) wurden für Biostimulation/Bioaugmentation bei Laborversuchen in Bodenproben eingesetzt. Das beste Ergebnis ist eine Erhöhung von circa 25 % des Abbaus der gesamten PAK im Vergleich zur Kontrolle, nach Inokulation des Pilzstammes *T. helicus* in zwei Bodenproben von unterschiedlicher Herkunft und Textur.

Der Aufnahmeprozess des BaP in Pilzzellen, eines PAK mit 5 aromatischen Ringen, wurde beim Pilzstamm *F. solani* mikroskopisch untersucht. Unsere Studie zeigt unser Kenntnis nach erstmals, dass dieses Molekül in den Pilzzellen durch einen aktiven vom Aktingerüst des Zytoskeletts abhängigen Prozess aufgenommen wird.

Diese Doktorarbeit öffnet somit neue Perspektiven für das Verständnis der Abbaumechanismen von PAK durch saprotrophe Bodenpilze und für die Entwicklung neuer Protokolle der Bioremediation von Böden.

Stichworte : Biologischer Abbau, Bodensanierung, Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe, saprotrophe Pilze, Boden

Abstract

Recent data reveal that Europe would include 342 000 contaminated sites and more than 2.5 million potentially contaminated sites. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) represent 11 % of soil contaminants with potentially consequences on mankind and ecosystems in the long run. Thus this PhD thesis is based on the study of telluric saprotrophic fungi for the development of PAH bioremediation protocols in the soils.

A collection of 30 fungal strains is built up using PAH historically contaminated soils originating from 4 different industrial sites in north of France (among which 2 come from the “Union” site in Roubaix). These strains are characterized for their ability to desorb and to degrade Benzo[a]pyrene (BaP) in mineral medium. Four strains (*Penicillium canescens*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani* and *Talaromyces helicus*) trigger BaP degradation rates above 30 % after 9 days of incubation in mineral medium under the experimental conditions used.

Correlations between BaP degradation rates and enzymatic activities described for their involvement in PAH degradation (lignin/manganese-peroxidases, laccase, epoxidase of cytochrome P450 and dioxygenases) or in oxidative stress (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and catalase) are looked for in a panel of 14 strains. Interesting agreements between BaP degradation abilities and extracellular (Ln/Mn POX, laccase) or cytochrome P450 linked (epoxidase) enzymatic activities are thus noticed. Three strains selected for their BaP degradation abilities and their enzymatic activities (*C. cladosporioides*, *F. solani* and *T. helicus*) are used for bioaugmentation/biostimulation lab experiments in historically PAH contaminated soil microcosms. The best result is an increase of approximately 25 % of the total PAH degradation compared to the controls after the inoculation of the strain *T. helicus* in two soil samples differing in terms of origins and textures.

The incorporation process of BaP, a 5 aromatic rings PAH, is investigated through microscopy approaches in the strain *F. solani*. Our study is the first to our knowledge to show that this molecule would be taken up by fungal cells through an active mechanism involving the actin network of the cytoskeleton.

This PhD work draws new perspectives for the understanding of PAH degradation mechanisms in telluric saprotrophic fungi and for the development of new soil bioremediation protocols.

Key words: Biodegradation, bioremediation, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, saprotrophic fungi, soil

Abréviations

- ABTS = 2,2-azino-bis-[3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulphonique]
- ACE = Acénaphène
- ACP = Analyse en Composantes Principales
- ACYL = Acénaphylène
- ANT = Anthracène
- BaA = Benzo[a]anthracène
- BASIAS = Base des Anciens Sites Industriels et Activités de Service
- BASOL = Base de données sur les sites et sols pollués
- BaP = Benzo[a]pyrène
- BbF = Benzo[b]fluoranthène
- BDAT = Base de Données Analyse des Terres
- BghiP = Benzo[g,h,i]pérylène
- BkF = Benzo[k]fluoranthène
- BSA = Bovine Serum Albumin
- CEC = Capacité d'Echange Cationique
- CHR = Chrysène
- DBA = Dibenzo[a,h]anthracène
- DMAB = Diméthylaminobenzène
- DMF = Diméthylformamide
- EDTA = Acide éthylène diamine tétraacétique
- EPF = Etablissement Public Foncier
- ERO = Espèces Réactives de l'Oxygène
- FLA = Fluoranthène
- FLU = Fluorène
- G6PD = Glucose-6-phosphate déshydrogénase
- GIS3SP = Groupement d'Intérêt Scientifique Sites, Sols et Sédiments Pollués
- GPOX = Glutathion peroxydase
- GSH = Glutathion (forme réduite)
- HAP = Hydrocarbure aromatique polycyclique
- IARC = International Agency for Research on Cancer
- IP = Indéno[1,2,3-cd]pyrène

- IPCR = équipe Interactions Plante-Champignon et Remédiation
- Ln POX = Lignine-peroxydase
- MBTH = 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone
- MEA = Malt Extract Agar
- MM = milieu minéral
- Mn POX = Manganèse-peroxydase
- NADP = Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- NAPH = Naphtalène
- NBT = Nitro bleu de tétrazolium
- NBP = γ -(4-nitrobenzyl)pyridine
- PHEN = Phénanthrène
- POP = Polluants Organiques Persistants
- PYR = Pyrène
- SEM = Société d'Economie Mixte
- SOD = Superoxyde dismutase
- TUM = Technische Universität München
- UCEIV = Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant
- ULCO = Université du Littoral Côte d'Opale
- US EPA = United States Environmental Protection Agency
- XO = Xanthine oxydase

Sommaire général

Introduction générale	2
Chapitre I : Obtention et caractérisation d'échantillons de sols industriels et réalisation d'une mycothèque	23
Chapitre II : Relation entre le métabolisme fongique et la biodégradation des HAP: étude en milieu minéral et en microcosmes de sol au laboratoire	61
Chapitre III : Mécanisme d'incorporation et de stockage intracellulaire des HAP chez <i>Fusarium solani</i>	109
Conclusion générale.....	138
Références.....	143
Annexes.....	166
Tables.....	190

Introduction générale

Sommaire

Sommaire	2
1. Problématique des sols pollués en Europe	3
2. Pollution des sols par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)	5
3. Le traitement des sols industriels et la bioremédiation	8
4. La biodégradation des HAP par les champignons	10
5. Activités enzymatiques impliquées dans la biodégradation des HAP	13
6. Problématique de la thèse.....	14
6.1. Interactions entre les HAP et la matrice du sol	15
6.2. La désorption des HAP des particules du sol vers la phase aqueuse.....	16
6.3. L'incorporation et le stockage des HAP dans les cellules fongiques étudiés chez la souche modèle <i>Fusarium solani</i>	17
6.4. Constitution d'une mycothèque à partir de sols historiquement contaminés en HAP	18
6.5. Enzymes impliquées dans la dégradation des HAP chez les souches saprotrophes .	19
7. Plan de thèse	21

1. Problématique des sols pollués en Europe

La contamination des sols est un problème répandu en Europe, mais avec des intensités et des importances variables selon les pays (American Environmental Protection Agency, US EPA, 2009). En 2011, le Centre Européen de Données sur les Sols de la Commission Européenne (European Soil Data Centre, ESDAC) a lancé un projet de collecte des informations sur les sites contaminés en Europe à partir des institutions nationales via le Réseau Européen d'Information et d'Observation sur l'Environnement (European Environment Information and Observation Network for soil EIONET-SOIL). L'étude des données fournies par les 33 pays participants permet d'extrapoler sur 38 pays un nombre de sites identifiés comme contaminés de 342 000 et de sites potentiellement contaminés dépassant les 2,5 millions (Panagos *et al.*, 2013). Cette étude permet également de distinguer le rôle des différentes activités humaines et en particulier des différentes industries sur la pollution des sols au niveau européen (figure i 1). Les analyses statistiques montrent que les déchets municipaux et industriels contribuent le plus aux contaminations des sols (37,2%) suivi des activités industrielles et commerciales (33,3 %). Parmi le secteur industriel et commercial, les résultats montrent la fréquence élevée des industries pétrolières et sidérurgiques en tant que sources de contamination des sols en Europe. En conséquence, les huiles minérales et les éléments traces métalliques contribuent à environ 60 % des contaminations des sols européens.

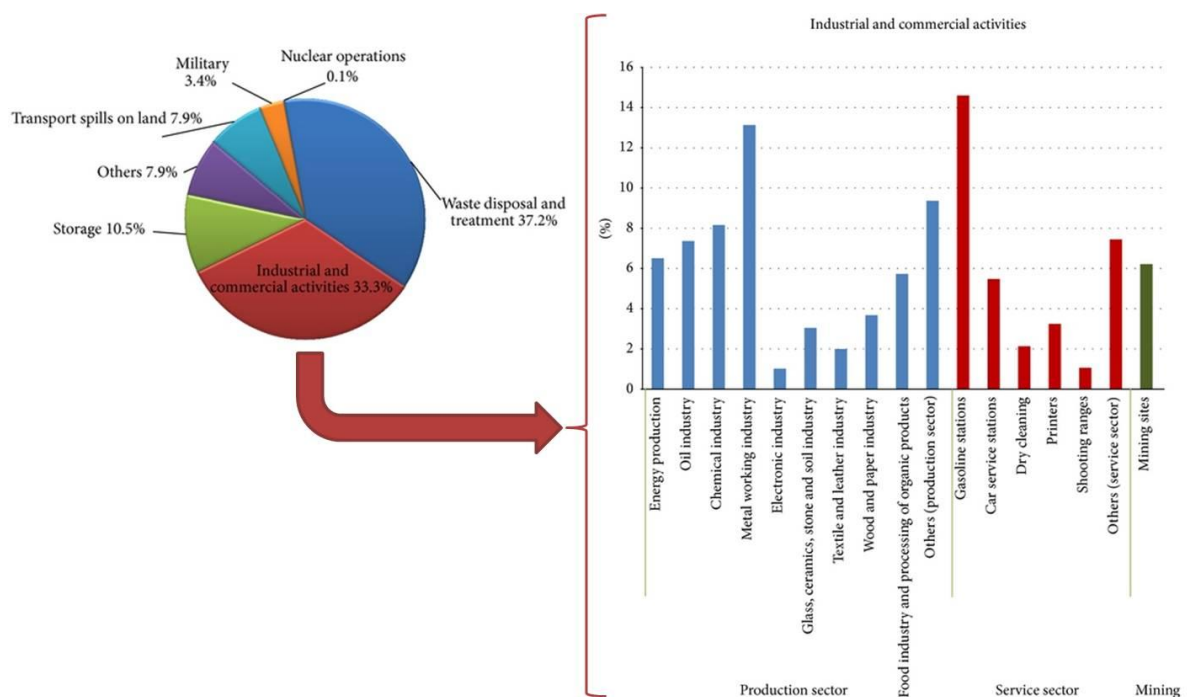


Figure i 1: Distribution des secteurs contribuant à la contamination des sols en Europe avec un focus particulier sur les activités industrielles et commerciales (Panagos *et al.*, 2013)

Les différences de définition des termes "friches industrielles" (Oliver *et al.*, 2005 ; NICOLE Brownfield Working Group, 2011) et "potentiellement contaminé" (Panagos *et al.*, 2013) entre les pays européens rendent les comparaisons des données nationales difficiles. Cependant, les résultats de l'ESDAC révèlent des densités similaires en France et en Allemagne de sites potentiellement contaminés en rapport à la population avec environ 4 sites potentiellement contaminés pour 1 000 habitants (Panagos *et al.*, 2013). Le nombre estimé de friches industrielles en France est de 200 000 avec une surface correspondante évaluée à 20 000 ha. La situation en Allemagne est de 362 000 friches industrielles pour une surface de 128 000 ha (Oliver *et al.*, 2005). La problématique des friches industrielles constitue ainsi un véritable enjeu dans les pays partenaires de cette thèse réalisée en cotutelle entre l'Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO, France) et la Technische Universität München (TUM, Allemagne).

La majorité des échantillons de sol utilisés dans notre étude provient de la région Nord-Pas-de-Calais (France). Le Nord-Pas-de-Calais combine une forte densité de population, une activité agricole importante et un passé industriel et minier qui ont généré une anthropisation élevée des sols. En 2002, le Nord-Pas-de-Calais rassemblait 14 % des sites pollués connus en France avec 483 sites et se plaçait ainsi au premier rang des régions françaises selon ce critère (Institut Français de l'Environnement, Ifen, 2004). Depuis, l'inventaire BASOL a permis d'identifier dans cette région 581 sites et sols pollués dont plus de la moitié ont été traités. Cependant, l'inventaire historique des sites industriels ou de service (BASIAS) a également dénombré plus de 16 700 sites susceptibles d'être pollués en Nord-Pas-de-Calais (Observatoire Régional de la Biodiversité en Nord-Pas-de-Calais, ORB NPdC, 2011). Ce nombre important de sites contaminés a des conséquences notamment au niveau de la biodiversité microbienne des sols. En effet, les sols de la région Nord-Pas-de-Calais sont globalement moins bien dotés en biomasses microbiennes que ceux des autres régions françaises (ORB NPdC, 2012).

En termes de budget, le coût de la gestion des sites contaminés est estimé à 6 milliards d'euros par an en Europe (Panagos *et al.*, 2013). Mais les contaminations des sols constituent également un problème économique dans la dynamique actuelle de requalification des friches industrielles. En effet, dans un contexte de pression foncière importante, le développement des villes nécessite la reconquête d'anciens sites ayant accueilli une activité polluante et intégrés aujourd'hui au tissu urbain. Ce processus de reconstruction de la ville sur elle-même permet en outre de limiter les effets néfastes de l'expansion urbaine sur l'environnement tels

que l'usage accru de l'automobile ou l'imperméabilisation des sols. Cette problématique est au centre des préoccupations actuelles en matière de protection des sols notamment en France (ADEME, 2012) et en Allemagne (Bundesministerium für Umwelt, BMU, 2013). Mais selon les principes de restriction d'usage en matière de sols pollués (Ministère de l'Écologie, du Développement durable, des Transports et du Logement, 2011) et de gestion des risques pour les populations, la reconversion de ces friches urbaines en terrains utilisables ne peut se faire qu'après leur réhabilitation selon l'usage ultérieur du site.

2. Pollution des sols par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

Parmi les polluants susceptibles d'impacter les sols, ce programme de thèse se focalise sur les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP). Les HAP sont des Polluants Organiques Persistants (POP) qui constituent un problème ubiquiste dans les écosystèmes du fait de leur toxicité, leur grande persistance et leur bioaccumulation dans les chaînes alimentaires (Cerniglia, 1992). Cette propriété s'explique par la structure chimique de ces molécules qui leur confère une faible biodisponibilité et une grande stabilité thermodynamique. Selon Semple *et al.* (2004 et 2007), la *fraction biodisponible* est définie comme la fraction librement disponible pour traverser la membrane cellulaire des organismes à un moment donné à partir du milieu où ils vivent. Cette notion est à différencier de la *fraction bioaccessible* qui correspond à la fraction susceptible de traverser la membrane cellulaire des organismes à partir du milieu où ils vivent si les organismes y avaient accès. Cependant cette fraction bioaccessible peut être séparée physiquement des organismes ou disponible après une période de temps (figure i 2).

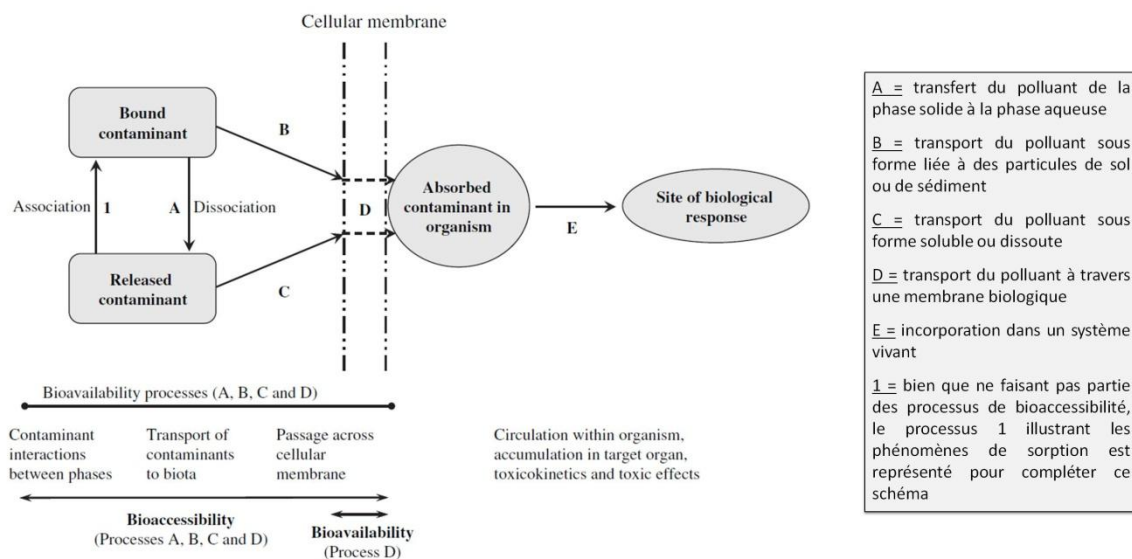








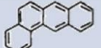
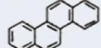
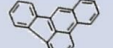
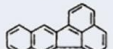

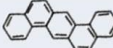
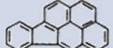



Figure i 2: Définition des notions de biodisponibilité et de bioaccessibilité (Semple *et al.*, 2007)

L'absence de groupement polaire dans la structure moléculaire des HAP (tableau i 1) est défavorable aux interactions avec les molécules d'eau nécessaires à leur solvatation. Cette propriété des HAP favorise leur adsorption aux particules solides et restreint l'accès à ces contaminants pour les microorganismes présents dans la phase aqueuse des sols (Mihelcic *et al.*, 1993). Leur structure chimique est également difficilement biodégradable du fait de la stabilité chimique conférée par la présence de plusieurs cycles aromatiques conjugués et la délocalisation du nuage électronique qui en résulte (Cerniglia, 1992 ; Wilson et Jones, 1993). Le clivage des cycles benzéniques est donc précédé dans la plupart des cas par des réactions oxydatives chimiques et/ou biologiques afin de déstabiliser ces structures (Park *et al.*, 1990a; Pothuluri et Cerniglia, 1998). La difficulté de biodégradation augmente avec le nombre de cycles aromatiques présents dans la molécule (Bossert et Bartha, 1986 ; Heitkamp et Cerniglia, 1987), ce qui a amené à distinguer les HAP de faibles masses molaires (inférieur à 4 cycles) des HAP de hautes masses molaires (supérieur ou égal à 4 cycles).

Tableau i 1: Propriétés physico-chimiques des 16 HAP de la liste US EPA (ATSDR, 1995)

Nom	N° CAS	Nb de cycles	Structure	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Log Kow	Solubilité aqueuse à 25°C (mg.L ⁻¹)
Naphtalène (NAPH)	91-20-3	2		128,2	3,3	32
Acénaphthylène (ACYL)	208-96-8	3		152,2	4,07	3,93
Acénaphthène (ACE)	83-32-9	3		154,2	3,98	3,42
Fluorène (FLU)	86-73-7	3		166,2	6,58	1,9
Phénanthrène (PHEN)	85-01-8	3		178,2	4,45	1
Anthracène (ANT)	120-12-7	3		178,2	4,45	0,07
Fluoranthène (FLA)	206-44-0	4		202,3	4,9	0,27
Pyrène (PYR)	129-00-0	4		202,3	4,88	0,16
Benzo[a]anthracène (BaA)	56-55-3	4		228,3	5,61	0,0057
Chrysène (CHR)	218-01-9	4		228,3	5,16	0,06
Benzo[b]fluoranthène (BbF)	205-99-2	5		252,3	6,04	0,001
Benzo[k]fluoranthène (BkF)	207-08-9	5		252,3	6,06	0,008
Benzo[a]pyrène (BaP)	50-32-8	5		252,3	6,06	0,0038
Dibenzo[a,h]anthracène (DBA)	53-70-3	5		278,3	6,84	0,0005
Indéno[1,2,3-cd]pyrène (IP)	193-39-5	6		276,3	6,58	0,0008
Benzo[g,h,i]pérylène (BghiP)	191-24-2	6		276,3	6,5	insoluble

Les HAP résultent de processus pyrolytiques, diagénétiques et pétrogéniques, d'où leur présence dans la composition du pétrole et lors de processus naturels tels que les feux de forêt ou les activités volcaniques. Ils proviennent également des activités anthropiques via la combustion incomplète de matières organiques et notamment du pétrole et de ses dérivés. Ces molécules complexes font partie des contaminants les plus fréquemment rencontrés sur des sites pollués de type anciennes usines à gaz, cokeries, sites de stockage pétrolier ou de traitement du bois (Juhász et Naidu, 2000 a). Mais leur distribution se révèle beaucoup plus large du fait de la très grande utilisation des produits dérivés du pétrole durant le siècle dernier en tant que solvants ou composés de synthèse pour l'industrie chimique et de carburant pour les transports (Giger & Blumer, 1974 ; Laflamme & Hites, 1978). En Europe, 14 % de la pollution des sols résulte de l'industrie pétrolière (US EPA, 2009) et les HAP représentent près de 11 % des contaminants des sols (Panagos *et al.*, 2013).

Les HAP sont des molécules très étudiées du fait des risques qu'ils représentent pour l'environnement et la santé humaine. Ils sont en effet classés depuis 1976 au sein de la liste des polluants prioritaires par l'US EPA au vu de leurs propriétés toxiques à l'égard du génome (tableau i 2) et de l'immunité (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR, 1995). Après activation notamment par des cytochromes P450, ces molécules peuvent en effet conduire à des mutations directement par la formation d'adduits à l'ADN ou par l'induction des processus de stress oxydant (Szentpály et Ghosh, 1998). Le tableau i 2 présente la classification établie par l'International Agency for Research on Cancer (IARC) selon la cancérogénicité des 16 HAP de la liste de l'US EPA.

Tableau i 2: Classification IARC des 16 HAP de la liste US EPA selon leur cancérogénicité (X = non classifié par l'IARC)

HAP (liste US EPA)	Classification IARC
Naphtalène (NAPH)	2B
Acénaphtylène (ACYL)	X
Acénaphtène (ACE)	3
Fluorène (FLE)	3
Phénanthrène (PHEN)	3
Anthracène (ANT)	3
Fluoranthène (FLA)	3
Pyrène (PYR)	3
Benzo[a]anthracène (BaA)	2B
Chrysène (CHRYS)	2B
Benzo[b]fluoranthène (BbF)	2B
Benzo[k]fluoranthène (BkF)	2B
Benzo[a]pyrène (BaP)	1
Dibenzo[a,h]anthracène (DBA)	2A
Indéno[1,2,3-cd]pyrène (IP)	2B
Benzo[g,h,i]pérylène (BghiP)	3

Groupe	Définition IARC
1	L'agent est cancérogène pour l'homme
2A	L'agent est probablement cancérogène pour l'homme
2B	L'agent est peut-être cancérogène pour l'homme
3	L'agent est inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'homme
4	L'agent n'est probablement pas cancérogène pour l'homme

3. Le traitement des sols industriels et la bioremédiation

La quantité de terres polluées traitées en France en 2010 est estimée à 3 700 000 tonnes dont près de la moitié a été envoyée en centres de stockage de déchets non-dangereux et inertes principalement après un prétraitement (ADEME, 2012). En Allemagne, ce sont plus de 100 millions de tonnes de terres qui sont excavées par année et qui doivent être traitées (Aktionsplattform Bodenschutz, ABo, 2012).

Les techniques de réhabilitation des sols sont divisées en quatre grandes familles selon la nature du traitement: procédés physiques, thermiques, chimiques et biologiques. Une distinction supplémentaire est faite au sein de ces grandes familles selon que la technique est applicable dans le sol en place (*in situ*) ou après excavation des sols (*ex situ*). Les techniques *ex situ* peuvent ensuite se décliner sur site ou hors site. En 2010, les deux techniques les plus utilisées par tonnage pour le traitement des sols pollués en France impliquent des procédés biologiques: les installations de traitement biologique hors site et le venting-bioventing *in situ* (figure i 3). La biodégradation des contaminants sur site est arrivée en troisième position et les démarches de bioaugmentation/biostimulation en cinquième position. L'intérêt croissant pour ces techniques et la marge de progression en terme quantitatif sont ainsi favorables au développement de nouveaux protocoles de bioremédiation *in situ*. La bioremédiation des sols peut faire intervenir différents types d'organismes comme les bactéries, les champignons (bioremédiation *stricto sensu*) ou les plantes (phytoREMÉDIATION) qui seront plus ou moins adaptés au traitement de différents types de contaminants (Vidali, 2001).

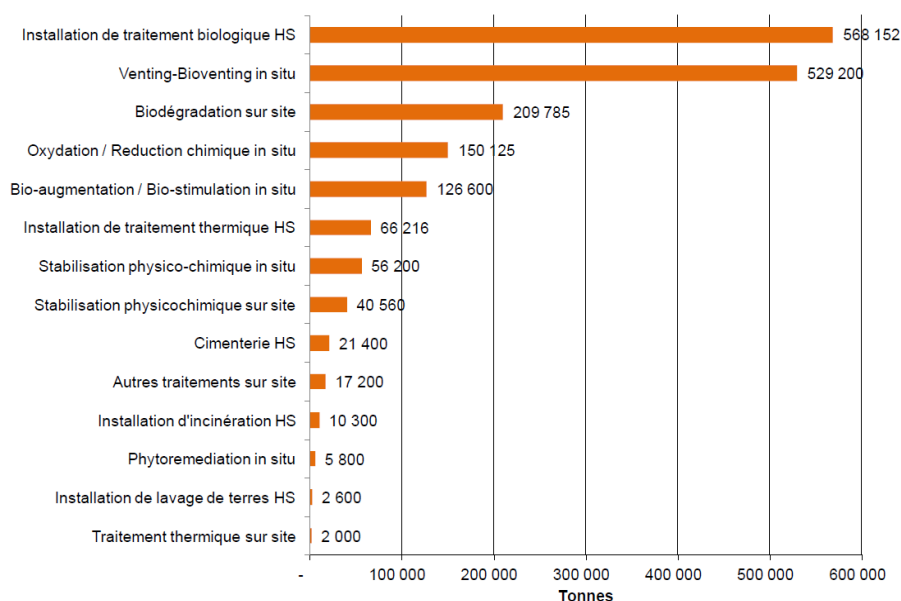


Figure i 3: Classement 2010 des filières et techniques de traitement des sols pollués par tonnage hors confinement et stockage (ADEME, 2012 ; HS = Hors Site)

Parmi les différentes techniques de dépollution des sols, la bioremédiation est une alternative intéressante aux autres procédés du fait de son impact environnemental réduit et de son faible coût (Daverey et Pakshirajan, 2011). La bioremédiation est définie comme la dégradation chimique de molécules organiques par des microorganismes (US EPA, 1995 a). Cette technique est particulièrement avantageuse en ce qui concerne des contaminations de faibles teneurs en polluant sur de grandes surfaces (Cerniglia, 1993). Malgré un temps d'action plus long (de l'ordre du mois voire de l'année), elle offre l'avantage de restituer un sol fonctionnel après traitement à la différence de méthodes plus agressives qui viennent altérer la biodiversité et parfois la structure du sol (Daverey et Pakshirajan, 2011). L'utilisation et le développement de protocoles de remédiation des sols respectueux de la biodiversité est importante du fait des fonctions de celle-ci pour le support du fonctionnement des (agro-) écosystèmes, la résistance et la résilience à des perturbations et des stress abiotiques ainsi que la limitation potentielle du développement d'agents phytopathogènes transmis par le sol (Brussaard *et al.*, 2007). Des avantages au niveau des coûts et de la faisabilité de la bioremédiation *in situ* par rapport aux processus d'excavation sont également évidents (De Kreuk, 2005). L'analyse des données du projet européen PURE (Protection of Underground REsources) obtenues entre 2001 et 2003 a en effet permis de classer la bioremédiation *in situ* en seconde position des techniques les moins coûteuses pour la dépollution des sols ($\approx 20-200 \text{ €/m}^3$, Summersgill, 2006). De plus les risques liés à l'excavation, la manipulation et le transport de matériaux nocifs sont également à prendre en considération (Vidali, 2001). Le développement de méthodes de bioremédiation *in situ* efficaces est donc souhaitable dans le contexte actuel de requalification des friches industrielles résultant du développement des villes et de la pénurie de terrains constructibles (ADEME, 2012).

Différentes stratégies regroupées sous le terme de bioremédiation peuvent être employées afin de dégrader efficacement les contaminants par voie microbienne. L'*atténuation naturelle contrôlée* correspond à l'étude de l'ensemble des phénomènes physiques, chimiques et biologiques intervenant dans la dégradation ou la transformation de contaminants dans l'environnement. La *bioremédiation intrinsèque* fait partie de l'approche d'atténuation naturelle contrôlée et repose sur le suivi de la microflore endogène du sol afin de s'assurer de la diminution de la contamination dans l'environnement affecté. La *bioremédiation augmentée* modifie les conditions de l'environnement microbien afin d'optimiser la dégradation. Elle comprend la *biostimulation* qui correspond à l'utilisation

d'amendements chimiques tels que l'air, des substrats organiques ou donneurs d'électrons, des nutriments et d'autres composés qui affectent les réactions métaboliques. La *bioaugmentation* consiste en l'introduction de microorganismes compétents dans la biodégradation des contaminants ciblés. Elle peut être requise pour des molécules spécifiques qui ne sont pas dégradées par la microflore endogène (US EPA, 2006 a).

4. La biodégradation des HAP par les champignons

La dégradation des HAP est documentée chez de nombreux microorganismes (Atlas, 1981 ; Samanta *et al.*, 2002 ; Al. Turki, 2009), mais la proportion de microorganismes ayant cette capacité est très variable au sein des différents écosystèmes (Leahy et Colwell, 1990). Si les applications dans le domaine de la bioremédiation se sont jusqu'à présent majoritairement focalisées sur les bactéries et la diversité métabolique qu'elles offrent, la bioremédiation fongique se révèle également prometteuse (Cerniglia, 1997). Ces microorganismes représentent environ 75% de la biomasse des sols (Ritz et Young, 2004) et peuvent former des réseaux mycéliens sur des centaines d'hectares (Ferguson *et al.*, 2003). Les champignons jouent des rôles très importants dans les grands cycles biogéochimiques (Gadd, 2007). Ce règne du vivant renferme ainsi des capacités enzymatiques très diverses dont la possibilité de dégrader les composants de la lignine du bois à la structure polyaromatique complexe (Bennett *et al.*, 2002). Ces capacités restent largement à étudier puisque moins de 10% des espèces ont été décrites sur les 1,5 millions estimées (Hawksworth & Mound, 1991 ; Hawksworth, 2001). De plus, des études plus récentes basées sur des techniques moléculaires de séquençage haut débit ont réévalué ce chiffre à un total estimé de 5,1 millions d'espèces fongiques (O'Brien *et al.*, 2005 ; Taylor *et al.*, 2010 ; Blackwell, 2011).

La morphologie des champignons peut être unicellulaire ronde (formes levuroïdes) ou correspondre à des filaments appelés hyphes constitués d'une ou plusieurs cellules (figure i 4). Les cellules fongiques présentent une organisation cellulaire caractéristique des Eucaryotes. Les particularités principales des cellules fongiques sont les vacuoles, les réserves d'ergostérol, et la structure et la composition de la paroi. Les cellules apicales des hyphes ont également la propriété d'être le siège de la croissance polarisée et présentent ainsi de nombreuses vésicules servant principalement à l'exocytose des constituants pariétaux au niveau de l'apex. L'ensemble des hyphes des champignons filamenteux constituent la partie végétative appelée "mycélium". La structure mycélienne de ces microorganismes se révèle également être un avantage pour la bioremédiation de par son caractère invasif qui permet la

prospection d'un grand volume du milieu contaminé avec une très grande surface d'échange (Bennett *et al.*, 2002). Des réseaux d'hyphes de 1 000 à 10 000 m de long peuvent en effet être trouvés par gramme de sol en surface (Ritz et Young, 2004).

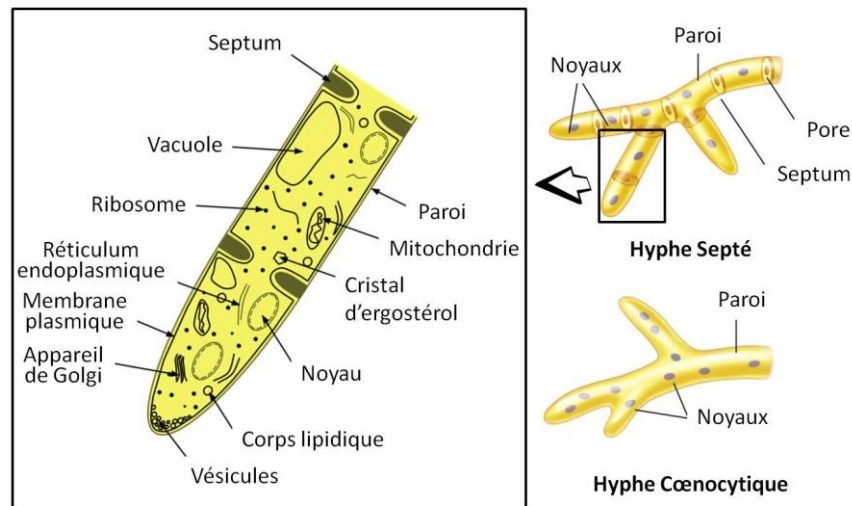


Figure i 4: Ultrastructure de la cellule fongique et catégories d'hyphes présentes chez les espèces filamenteuses

Bien que moins étudiés que les bactéries dans le domaine de la bioremédiation, les champignons apparaissent très intéressants pour la dégradation des HAP en particulier de hautes masses molaires (Cerniglia, 1992 ; Juhasz et Naidu, 2000 a ; Zhang *et al.*, 2006). Cette propriété est à mettre en lien avec les capacités métaboliques du règne fongique qui leur permettent de dégrader des molécules naturelles complexes (Bennett *et al.*, 2002). En particulier, la faculté propre au règne fongique de dégrader la lignine, un polymère de structure complexe et aléatoire contenant des noyaux aromatiques, a orienté un grand nombre de chercheurs vers l'étude des capacités des champignons lignolytiques (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*...) à dégrader les HAP (exemples : Eggen et Majcherczyk, 1998 ; Martens *et al.*, 1999 ; Dzul-Puc *et al.*, 2005 ; Mollea *et al.*, 2005 ; Tekere *et al.*, 2005 ; Hadibarata, 2009 ; Acevedo *et al.*, 2011 ; Zebulun *et al.*, 2011). La lignine est en effet constituée de monomères ou "monolignols" (alcool para-coumarylique, alcool coniférylique et alcool sinapylique) contenant chacun un cycle benzénique. Ces expériences ont confirmé qu'en raison de leur faible sélectivité de substrat, des enzymes extracellulaires produites par les champignons lignolytiques sont efficaces pour la bioremédiation des HAP. Ces enzymes de type laccase, lignine- et manganèse-peroxydase produisent en effet des agents oxydants qui vont ensuite réagir chimiquement avec les substrats, affranchissant ainsi la réaction de toute sélectivité catalytique (Johnsen *et al.*, 2005). Cette dégradation aspécifique passe aussi par la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène

(ERO) par des oxydases. Les ERO sont des dérivés très réactifs de l'oxygène regroupant des radicaux libres ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{RO}_2\cdot$) et des produits non radicalaires (H_2O_2 , RO_2H , $^1\text{O}_2$). Malgré une grande efficacité en conditions contrôlées, des essais de bioaugmentation en sol ont montré les limites de cette approche du fait de la faible adaptation des champignons lignolytiques à ce milieu et de leur faible compétitivité avec les souches endogènes telluriques (Baldrian, 2008 ; Borràs *et al.*, 2010).

Ainsi l'étude des capacités de dégradation des HAP a également porté sur des souches fongiques telluriques. Ces souches sont en effet plus adaptées aux conditions environnementales du sol, ce qui les rend théoriquement plus à même de subir la compétition des autres organismes présents. En particulier les souches saprotrophes se nourrissent de matières organiques en décomposition contenant aussi des molécules complexes dont la lignine (Falcón *et al.*, 1995 ; Rodriguez *et al.*, 1996) et possèdent ainsi un potentiel pour des utilisations en bioremédiation. Des études en sol ont en effet déjà montré l'efficacité des souches saprotrophes pour la dégradation des HAP (Atagana *et al.*, 2006 ; Guiraud *et al.*, 2003 ; Potin *et al.*, 2004) qui se révèle comparable à celle des champignons lignolytiques (Colombo, 1996).

Dans la classification actuelle des champignons, les Eumycota (règne des eumycètes, fungi ou vrais champignons) sont distingués des organismes fongiformes désormais classés dans d'autres règnes. Nous nous intéressons dans cette étude aux eumycètes saprotrophes telluriques qui appartiennent aux embranchements des Zygomycota (Zygomycètes), des Ascomycota (Ascomycètes), des Basidiomycota (Basidiomycètes) et des Deuteromycota (Deutéromycètes) (Barr, 1992). Les Zygomycètes correspondent aux formes les plus primitives avec des hyphes cœnocytiqes non cloisonnés ou "siphons". Il s'agit d'un groupe polyphylétique de champignons produisant des méiospores non flagellées appelées "zygospores". Les espèces de cette division sont caractérisées par une abondante reproduction asexuée et une croissance rapide qui leur permet la colonisation efficace des milieux (Blackwell et Spatafora, 2004). Les Ascomycètes constituent le plus vaste embranchement du règne fongique avec environ 32 000 espèces (Hawksworth *et al.*, 1995). La dénomination résulte de leur reproduction sexuée impliquant des sporocystes appelés "asques" qui contiennent les méiospores appelées "ascospores". Mais la reproduction asexuée par la production de "conidies" est prédominante chez cette division et a permis leur expansion. Plus précisément, la plupart des espèces filamenteuses appartient aux Euascomycètes qui représentent sans doute la classe la plus prospère du règne fongique (Blackwell et Spatafora,

2004). La présence de formes de reproduction sexuées et asexuées a entraîné une double dénomination de beaucoup d'espèces de cette division selon des critères morphologiques. Les Basidiomycètes constituent le second plus grand phylum du règne fongique avec 23 000 espèces environ (Hawksworth *et al.*, 1995). Ces champignons constituent la plupart des espèces macroscopiques connues mais incluent également des micromycètes filamenteux. Le nom de cet embranchement provient de leur reproduction sexuée qui fait intervenir des "basidiospores" portées à l'extérieur du méiosporocyste ou "baside" (Patouillard, 1900). Les Basidiomycètes sont regroupés avec les Ascomycètes au sein de l'ensemble des Dicaryomycota (Dicaryomycètes). La reproduction asexuée par production de conidies joue un rôle moins important chez les Basidiomycètes que chez les Ascomycètes. La division des Deutéromycètes regroupe les champignons filamenteux septés dont la reproduction sexuée n'est pas connue. Il s'agit ainsi d'un groupe polyphylétique artificiel regroupant les formes asexuées de champignons Ascomycètes et Basidiomycètes (Barnett et Hunter, 1998). Du fait des avancées dans les techniques d'identification moléculaire, cette division est de moins en moins reconnue dans les nouvelles classifications. Cependant par commodité de rédaction, nous garderons ce terme dans le mémoire.

5. Activités enzymatiques impliquées dans la biodégradation des HAP

La biodégradation des HAP par les microorganismes a été décrite principalement chez les bactéries, les champignons et les algues en conditions aérobies (Cerniglia, 1992). Différentes voies métaboliques sont ainsi impliquées selon le type d'organisme (figure i 5).

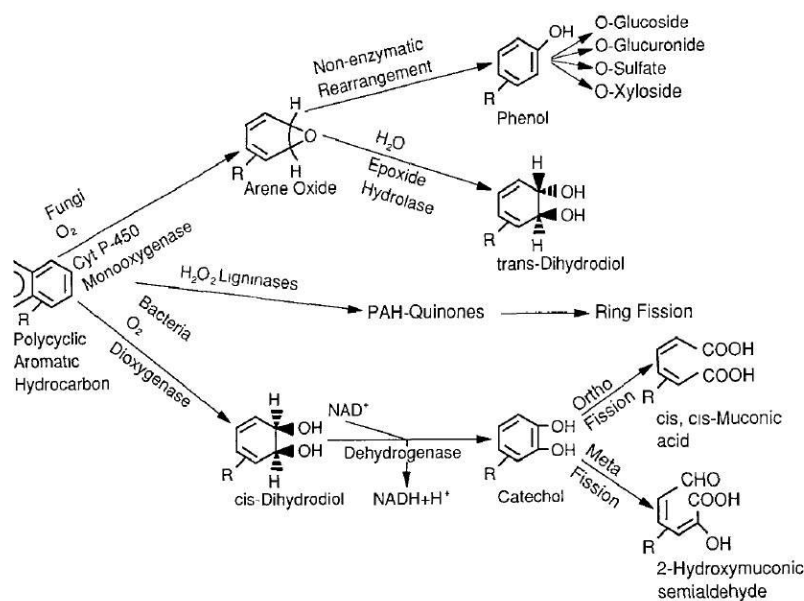


Figure i 5: Voies métaboliques de biodégradation des HAP (Cerniglia, 1992)

Le principal point de variation entre les différentes voies métaboliques est la stratégie de déstabilisation des cycles aromatiques. Les bactéries sont décrites pour initier l'oxydation des cycles aromatiques par des dioxygénases qui attaquent les doubles liaisons par l'addition de deux molécules d'oxygène. Certaines bactéries sont également décrites pour dégrader les HAP en conditions anaérobies en activant la molécule par une carboxylation ou le greffage d'un groupement fumarate (Meckenstock *et al.*, 2004). Chez les eucaryotes comme les algues ou les champignons, la voie impliquée est le processus de détoxification du cytochrome P450 impliquant une activité monooxygénase. L'intermédiaire époxyde obtenu par l'addition d'un atome d'oxygène est ensuite réarrangé de manière enzymatique ou non. La troisième voie implique la production d'enzymes extracellulaires capables d'oxyder les HAP par des activités de type peroxydase ou laccase. Cette voie de dégradation est principalement décrite chez des champignons lignolytiques.

Les mécanismes impliqués dans la dégradation des HAP par les champignons sont majoritairement des co-métabolismes, c'est-à-dire une dégradation sans bénéfice direct de matière ou d'énergie pour l'organisme qui en est responsable. Ces processus nécessitent ainsi l'utilisation d'autres substrats en tant que source de carbone ou donneur d'électrons.

6. Problématique de la thèse

L'étude de la bibliographie révèle deux étapes clés dans le traitement des contaminations des sols par les HAP via la bioremédiation. Celles-ci sont liées aux propriétés chimiques de ces molécules à savoir leur faible biodisponibilité et la difficulté d'amorçage de leur oxydation. Ainsi la compréhension des processus intervenant dans la dégradation des HAP par des souches fongiques efficaces est importante pour le développement de méthodes de bioremédiation. La figure i 6 présente les grandes questions posées lors de la dégradation des HAP dans les sols par certaines souches fongiques saprotrophes.

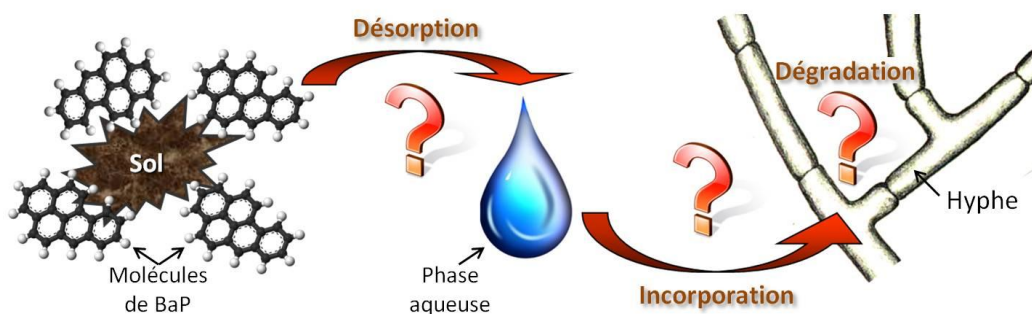


Figure i 6: Etapes clés du processus de bioremédiation fongique des HAP en sol sur l'exemple du Benzo[a]pyrène (BaP), un HAP de haute masse molaire

6.1. Interactions entre les HAP et la matrice du sol

L'efficacité de décontamination d'un sol impacté par des HAP dépend de la technique employée mais également des propriétés physico-chimiques du sol et de l'âge de la contamination. En effet, selon Bogan et Trbovic (2003), la difficulté d'oxydation chimique des HAP dépend principalement du carbone organique total (Total Organic Carbon, TOC) lorsqu'il est supérieur à 5%. Par contre lorsque les teneurs en TOC sont faibles, la porosité des sols devient le facteur prépondérant. De plus, l'implication de la porosité augmente avec le temps de résidence de la contamination dans le sol.

La séquestration des HAP dans un sol englobe trois phénomènes : l'association, la rétention et la sorption des molécules avec la matrice solide. Elle implique ainsi l'association des HAP aux colloïdes par partitionnement hydrophobe et par formation de liaisons chimiques ou physiques. Des composés hydrophobes comme les HAP sont principalement retenus par les composés organiques du sol incluant des matériaux humiques condensés et des particules de suie (Juhasz, 2008). La nature de la matière organique du sol a ainsi une grande influence sur les interactions avec ces molécules. En particulier le degré d'aromaticité de la matière organique influe sur l'hydrophobie des matières organiques et leur capacité de séquestration des HAP (Gauthier *et al.*, 1987). La séquestration des HAP résulte de leur incorporation à la matière organique naturelle, leur diffusion dans les nanopores et leur adsorption aux particules (Juhasz, 2008).

Ces différents états rendront les contaminants plus ou moins sensibles à la dégradation notamment biologique. Alors que les molécules adsorbées en surface des particules seront encore relativement accessibles, les molécules ayant diffusé dans la matière organique ou dans les nanopores seront plus difficilement désorbables et accessibles aux microorganismes se développant en phase aqueuse (Juhasz, 2008). La teneur en matière organique étant liée à la teneur en TOC, le mode de séquestration des HAP explique l'influence du TOC sur l'efficacité d'oxydation de ces molécules. De même, la diffusion des molécules de HAP au sein des nanopores au cours du temps explique le rôle de plus en plus important de la porosité du sol dans la séquestration des HAP avec l'âge de la contamination.

Bien que les teneurs en HAP dans les sols puissent diminuer par volatilisation, photolyse ou oxydation chimique, la biodégradation est la voie principale de leur dégradation dans l'environnement (Haritash et Kaushik, 2009). Les propriétés physico-chimiques du sol vont également conditionner la vie des microorganismes qui y résident et leur aptitude à

dégrader des contaminants. Notamment le pH, la température, la teneur en oxygène et l'accès aux nutriments sont décrits pour influencer sur la biodégradation des hydrocarbures (Mohn, 2004). La contamination intervient également dans la sélection des organismes présents qui doivent être capables de résister aux phénomènes de toxicité et poursuivre leur développement dans ces nouvelles conditions environnementales. Selon la composition de la microflore originelle du sol, certains microorganismes pourront ainsi trouver un avantage dans les nouvelles conditions offertes par la contamination et même être capables de dégrader les contaminants. La biodégradation des HAP en sol est ainsi décrite pour suivre une courbe biphasique (Juhász, 2008). La première phase représente une diminution rapide des teneurs en HAP suite à la stimulation des microorganismes capables de les dégrader. La cinétique de dégradation microbienne gouverne cette phase et n'est pas limitée par la vitesse de désorption des HAP à partir de la matrice du sol (Bosma *et al.*, 1997). La seconde phase représente une dégradation lente où, après déplétion de la fraction accessible, la biodisponibilité des molécules restantes est devenue le paramètre limitant (Juhász *et al.*, 2000 b). Il est ainsi intéressant d'isoler des microorganismes de sols historiquement contaminés pour leurs potentialités de résistance aux toxicités des polluants, d'augmentation de la biodisponibilité et de biodégradation des HAP.

6.2. La désorption des HAP des particules du sol vers la phase aqueuse

Certains microorganismes sont capables de se développer sur des substrats hydrophobes par la production des tensioactifs biologiques qui désorbent et augmentent la solubilité aqueuse apparente des molécules hydrophobes (Marcoux, 2000). Les biosurfactants correspondent à des tensioactifs de faibles masses molaires qui vont réduire les tensions de surface aux interfaces eau/air ou eau/huile. Ils sont ainsi distingués des bioémulsifiants qui correspondent à des tensioactifs de haute masse molaire ayant pour action de stabiliser les émulsions eau/huile (Banat *et al.*, 2010). Ces tensioactifs d'origine biologique sont étudiés depuis une vingtaine d'années notamment dans le cadre du traitement par les bactéries des pollutions au pétrole. Ils suscitent particulièrement l'intérêt du fait de leur biodégradabilité et de leur production via des ressources renouvelables à savoir les substrats bactériens (Banat, 1995 ; Mohan *et al.*, 2006). Un autre avantage est leur efficacité 10 à 40 fois plus élevée que celle des surfactants chimiques (Desai et Banat, 1997). Leur rôle est aujourd'hui reconnu comme de premier ordre dans les processus de bioremédiation (Ron et Rosenberg, 2002 ; Mulligan, 2005).

Bien que moins étudiés pour cette capacité, les champignons sont également connus pour la sécrétion de tensioactifs (Jones, 1997). La production de biosurfactants de type sphorolipides a été décrite chez des levures principalement du genre *Candida* mais aussi *Pichia* et *Wickerhamiella* (Daverey et Pakshirajan, 2011). L'ajout de sphorolipides en bioréacteur entraîne un effet stimulateur de 95% sur la biodégradation des HAP par la microflore endogène d'un sol (Oberbremer *et al.*, 1990). *Candida lipolytica* est également décrite comme productrice du bioémulsifiant Liposan de nature glycoprotéique (Cirigliano et Carman, 1985). La synthèse de tensioactifs biologiques est également décrite chez des champignons filamenteux. Le bioémulsifiant de *Curvularia lunata* a été caractérisé comme constitué d'un complexe de protéines et de polysaccharides (Paraszkiewicz *et al.*, 2002). *Penicillium citrinum* est décrit comme capable de produire un glycolipide en présence d'huile d'olive avec une activité émulsifiante pour le xylène et le diesel (Camargo-de-Morais *et al.*, 2003). En lien direct avec la bioremédiation des HAP, la production et les propriétés d'un bioémulsifiant ont également été décrites chez *Penicillium sp.* en présence de phénanthrène (Luna-Velasco *et al.*, 2007). De même, la sécrétion de biosurfactants a été observée chez *Cladosporium resinae* en présence d'hydrocarbures (Muriel *et al.*, 1996). L'étude des tensioactifs biologiques encore peu développée chez les champignons filamenteux apparaît prometteuse dans le domaine de la bioremédiation des HAP. Il est ainsi intéressant d'inclure la capacité d'augmentation de la solubilité aqueuse apparente des HAP dans la sélection de souches lors d'études de bioremédiation fongique. Cependant des études du temps de demi-vie des molécules de HAP une fois désorbées sont nécessaires afin de prévenir l'augmentation de transfert de polluants vers les nappes souterraines. Des tests écotoxicologiques peuvent également être utilisés pour évaluer l'impact de l'augmentation de la solubilité aqueuse des HAP sur leur toxicité au sein des sols (Lors *et al.*, 2012).

6.3. L'incorporation et le stockage des HAP dans les cellules fongiques étudiés chez la souche modèle *Fusarium solani*

Dans la recherche de souches fongiques filamenteuses avec un potentiel de dégradation des HAP de hautes masses molaires, une mycothèque de champignons telluriques originaires de sols contaminés a été établie par le laboratoire d'accueil français (équipe IPCR "Interactions Plantes-Champignons et Remédiation", UCEIV, ULCO, Dunkerque) lors d'études antérieures (Rafin *et al.*, 2000 et 2013 ; Potin *et al.*, 2004 a et b). Parmi elles, le champignon *Fusarium solani* (téléomorphe : *Haematonectria haematococca*, Ascomycète, Hypocréales, Nectriaceae) a été sélectionné comme modèle d'étude du fait de ses capacités à

métaboliser et à minéraliser le Benzo[a]pyrène (Rafin *et al.*, 2000, 2004 et 2006 ; Veignie *et al.*, 2002). La dégradation du BaP par cette souche fongique a conduit à l'identification de métabolites dont le 6-hydroxybenzo[a]pyrène sulfate (Veignie *et al.*, 2002). Ce composé est décrit comme étant le produit de détoxification du BaP par l'activité monooxygénase des cytochromes P450 et des activités aryl-sulfatases (Rafin *et al.*, 2000 et 2006). Des quinones ont également été mises en évidence lors de ces précédentes études (Veignie *et al.*, 2002) et pourraient aussi résulter de l'oxydation des HAP par les cytochromes P450 (Cavalieri et Rogan, 1985 et 1995).

La caractérisation des métabolites issus de la dégradation du BaP par *F. solani* suggère ainsi que le processus de biodégradation de cet HAP a lieu au moins partiellement dans le compartiment intracellulaire. Pour que cela soit possible, différentes étapes sont nécessaires en amont de la dégradation : l'accès du mycélium aux molécules de BaP, l'incorporation de ces molécules dans les cellules fongiques et leur acheminement vers les sites intracellulaires de stockage et de dégradation. Les mécanismes cellulaires impliqués dans l'incorporation de composés organiques hydrophobes et leur transport intracellulaire restent peu compris. La majorité des travaux concerne l'entrée des alcanes dans les cellules des levures (Käppeli *et al.*, 1984) et des champignons filamenteux (Cooney *et al.*, 1980 ; Lindley et Heydeman, 1983, 1986 a et b), mais l'incorporation des HAP dans les cellules fongiques reste plus rarement étudiée (Wu *et al.*, 2009 ; Deng *et al.*, 2010). Pourtant la grande hydrophobie de ces composés constitue un véritable obstacle au contact avec les surfaces cellulaires entourées d'un compartiment aqueux et conduit à des questions quant à leur mode d'incorporation.

6.4. Constitution d'une mycothèque à partir de sols historiquement contaminés en HAP

Dans notre étude, une mycothèque est constituée à partir de sols présentant une contamination historique en HAP afin d'étudier les processus de dégradation des HAP chez les champignons saprotrophes telluriques indigènes de ces sols. Selon Chesters et Thornton (1956), deux grands groupes de méthodes d'isolement peuvent être distingués pour l'étude des champignons telluriques: les méthodes d'inoculation directe à partir de sol ("screened immersion plates", "immersion tubes", "direct inoculation") et les méthodes passant par la réalisation d'une suspension de sol ("dilution plates", "soil plates").

Les méthodes d'inoculation directe consistent à laisser croître les hyphes fongiques dans un milieu gélosé directement à partir du sol d'origine puis de les isoler. Ces méthodes

permettent ainsi d'isoler des espèces capables de se développer dans les conditions offertes par leur sol d'origine. Cependant les techniques employées sont souvent complexes et la conservation de la souche après isolement reste dépendante du milieu utilisé.

Les méthodes passant par une suspension sont les plus couramment employées du fait de leur facilité de réalisation (exemples : Warcup, 1957 ; Deacon *et al.*, 2006 ; Arenz et Blanchette, 2011). Elles utilisent soit le surnageant d'une suspension de sol ("dilution plates") ou la totalité de la suspension ("soil plates") pour inoculer des milieux solides. Les souches sont ensuite isolées par repiquage des colonies après croissance. Seules les souches capables de se développer dans les conditions offertes par le milieu de culture utilisé seront ainsi repérées.

Chacune de ces méthodes apporte un biais dans la composition des souches isolées (Garrett, 1951). Notamment les méthodes faisant appel à une suspension de sol sont décrites pour favoriser les espèces sporulantes (Chesters et Thornton, 1956 ; Johansson, 2001). Afin d'augmenter la diversité des souches isolées, il est ainsi recommandé d'employer plusieurs techniques et de varier la composition des milieux (Bills *et al.*, 2004). Les isolements réalisés dans le cadre de cette étude n'ont pas pour objectif de réaliser un inventaire exhaustif des souches fongiques présentes. Cependant afin d'élargir les possibilités d'isolement de souches intéressantes pour la bioremédiation des HAP, une méthode d'inoculation directe et une méthode de suspension/dilution sont utilisées dans cette étude.

6.5. Enzymes impliquées dans la dégradation des HAP chez les souches saprotrophes

Il est généralement admis que la dégradation des HAP par les champignons non-lignolytiques est liée au mécanisme de détoxification des xénobiotiques du cytochrome P450 (Juhász et Naidu, 2000 a). Mais Veignie *et al.* (2004) et Rafin *et al.* (2006) ont souligné l'implication possible de mécanismes chimiques de type réaction de Fenton avec les ERO produits par les cellules fongiques chez *Fusarium solani* (S19).

La détoxification des composés aromatiques par le cytochrome P450 consiste en l'ajout d'un atome d'oxygène via une activité monooxygénase ou époxydase (Cerniglia, 1992). L'activité enzymatique la plus décrite chez les bactéries pour le clivage des cycles aromatiques est l'activité dioxygénase qui incorpore les deux atomes du dioxygène afin d'éliminer des liaisons chimiques (Juhász et Naidu, 2000 a). Longtemps réputée propre aux procaryotes, cette activité commence à être décrite chez les champignons (Rieble *et al.*, 1994 ;

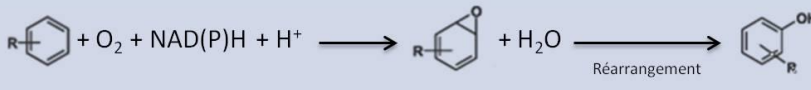
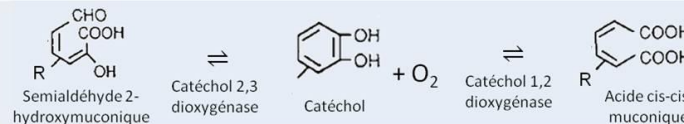
Cultrone *et al.*, 2005 ; Wadman *et al.*, 2009) et l'étude de son implication dans la dégradation des HAP pourrait se révéler intéressante.

Des activités enzymatiques présentant aussi un grand intérêt pour la compréhension des mécanismes de dégradation des HAP catalysent la génération d'agents oxydants ou la détoxification des ERO, ces molécules étant impliquées dans l'oxydation des composés aromatiques. Parmi les enzymes générant des agents oxydants se trouvent des peroxydases et plus particulièrement les lignine- (LnPOX) et manganèse-peroxydases (MnPOX) déjà décrites dans les processus de dégradation des HAP. Les lignine-peroxydases utilisent le peroxyde d'hydrogène généré notamment par des oxydases pour réaliser une oxydation à un électron de différentes structures aromatiques apparentées à la lignine aboutissant à la formation de radicaux de cations aryl. Ces radicaux cationiques réactifs sont capables à leur tour d'attaquer chimiquement le polymère de lignine (Pelmont, 1995). Les manganèse-peroxydases catalysent l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène du Mn^{2+} en Mn^{3+} qui va lui-même oxyder une variété de substrats phénoliques. Egalement impliquées dans la génération d'agents oxydants, les laccases utilisent l'oxygène moléculaire pour l'oxydation de substrats phénoliques en radicaux phénoxy (Gianfreda et Rao, 2004).

Les enzymes de détoxification des ERO sont nécessaires pour la survie des tous les organismes aérobies. En effet, certaines voies métaboliques utilisant l'oxygène dont la respiration génèrent inévitablement des ERO qui peuvent réagir avec des composants cellulaires et les endommager. Ces enzymes éliminent donc les ERO de manière constitutive chez les organismes aérobies, mais peuvent également augmenter leur activité en cas de stress oxydant. Le stress oxydant est une situation où la cellule va générer une plus grande quantité d'ERO que lors de son fonctionnement normal. Ce type de situation peut résulter de différents facteurs dont l'exposition à des xénobiotiques. Beaucoup de réactions enzymatiques de détoxification des ERO sont communes à différents groupes phylogénétiques dont celui des champignons (Lushchak, 2011). Trois activités majeures se distinguent parmi elles: la superoxyde dismutase qui convertit les anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène, la catalase qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène formant de l'eau et du dioxygène, et la glutathion-peroxydase qui entraîne la destruction réductive de l'hydrogène et des hydroperoxydes de lipide en utilisant le glutathion comme donneur d'électrons. La glucose-6-phosphate est une enzyme intervenant de manière indirecte dans le contrôle du stress oxydant puisqu'elle génère par oxydation du glucose-6-phosphate du pouvoir réducteur sous la forme de NADPH qui sera ensuite transféré au glutathion par

l'intermédiaire de la glutathion réductase et utilisé pour la détoxification des ERO par la glutathion-peroxydase (Harris, 1992). Le tableau i 3 résume les activités enzymatiques qui sont étudiées dans le cadre de ce travail.

Tableau i 3: Réactions enzymatiques possiblement impliquées dans les mécanismes de dégradation des HAP chez les champignons

	Enzyme	Réaction catalysée
Oxydation directe	Cytochrome P450 (EC 1.14.-.-)	
	Dioxygénase (EC 1.13.11.-)	
Production d'agents oxydants	Lignine-peroxydase (EC 1.11.1.14)	$2 \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Noyaux aromatiques} \rightleftharpoons \text{Radicaux cations aryl} + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2^{\cdot -}$
	Manganèse-peroxydase (EC 1.11.1.13)	$2 \text{Mn}^{2+} + 2 \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons 2 \text{Mn}^{3+} + 2 \text{H}_2\text{O}$
	Laccase (EC 1.10.3.2)	$\text{O}_2 + 4 \text{Phénols} \rightleftharpoons 4 \text{Radicaux phénoxy} + 2 \text{H}_2\text{O}$
Détoxification des ERO	Superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1)	$\text{O}_2^{\cdot -} + \text{O}_2^{\cdot -} + 2 \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
	Catalase (EC 1.11.1.6)	$2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$
	Glutathion-peroxydase (EC 1.11.1.9)	$\text{ROOH} + 2\text{GSH} \rightleftharpoons \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$
	Glucose-6-P déshydrogénase (EC 1.1.1.49)	$\text{D-glucose-6-P} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{6-phospho-D-glucono-1,5-lactone} + \text{NADPH} + \text{H}^+$

7. Plan de thèse

Le travail de cette thèse a été réalisé entre les laboratoires de l'UCEIV (ULCO, Dunkerque) et du Helmholtz Zentrum de Munich dans le cadre d'une cotutelle de thèse (ULCO - TUM) et d'un Partenariat Hubert Curien (PHC PROCOPE, 2012-2013). Cette cotutelle a enrichi scientifiquement le programme de cette thèse qui comprend des points de recherche fondamentale et des aspects plus proches de la recherche appliquée. Les travaux réalisés en dehors du laboratoire UCEIV (ULCO) sont spécifiquement précisés dans le mémoire. Le plan de ce mémoire est subdivisé en trois chapitres.

Le chapitre I décrit l'obtention et la caractérisation d'échantillons de sols industriels historiquement contaminés et la constitution d'une mycothèque. La description des échantillons de sol concerne l'historique des contaminations, le contexte géologique des sites industriels étudiés, les analyses pédologiques et des contaminations en HAP des échantillons. La constitution de la mycothèque se réfère aux techniques d'isolement de souches saprotrophes à partir des échantillons de sols industriels et à la caractérisation des souches de la collection obtenue.

Le chapitre II est composé de trois phases. La première phase concerne la caractérisation en milieu minéral des capacités de désorption et de dégradation d'un HAP modèle de haute masse molaire, le Benzo[a]pyrène (BaP), par les souches de la mycothèque. La seconde phase consiste en l'étude des activités enzymatiques possiblement associées à la dégradation du BaP chez différentes souches de la mycothèque toujours en conditions contrôlées. La troisième phase correspond à une démarche de bioaugmentation et de biostimulation conduite en microcosmes de sols au laboratoire. L'effet de l'inoculation de trois souches fongiques sélectionnées d'après leurs propriétés de désorption, de dégradation et d'activités enzymatiques et l'influence d'apports nutritifs sur la dégradation de contaminations historiques en HAP sont en effet étudiés dans deux échantillons de sol historiquement contaminés.

Le chapitre III se concentre sur la compréhension du mécanisme d'incorporation du BaP chez la souche modèle *Fusarium solani* et plus précisément sur les phases d'entrée de la molécule dans la cellule fongique et de stockage dans un compartiment intracellulaire.

Cette démarche scientifique est synthétisée sur une page volante jointe à ce manuscrit.

Chapitre I : Obtention et caractérisation d'échantillons de sols industriels et réalisation d'une mycothèque

Sommaire

Sommaire	23
Introduction	25
Matériels et méthodes	26
1. Produits chimiques.....	26
1.1. Solvant	26
1.2. Antibiotiques	26
2. Recherche d'informations sur les sites d'étude.....	26
3. Prélèvement et analyses physico-chimiques des échantillons de sol.....	26
3.1. Conditions d'échantillonnage.....	26
3.2. Conservation des échantillons.....	27
3.3. Caractérisation pédologique des échantillons	27
3.4. Rétention hydrique des échantillons de sol	27
3.5. Mesure des contaminations en HAP	27
4. Isolement de souches fongiques.....	28
4.1. Milieux de culture.....	28
4.2. Méthodes d'isolement	29
4.3. Technique d'identification.....	30
5. Traitements mathématiques.....	31
Résultats et Discussion	31
1. Informations sur les sites d'études	31
1.1. Site de l'Union (Roubaix)	31
1.1.1. Dépôt de bus (site A)	34
1.1.2. Usine à gaz (site C).....	35

1.2.	Site de Dunkerque (site B).....	36
1.3.	Site de Moulin Neuf (site D)	37
2.	Analyses physico-chimiques des échantillons de sol	39
2.1.	Analyse des contaminations en HAP	39
2.2.	Propriétés pédologiques et hydriques des échantillons	43
3.	Isolement de souches fongiques.....	51
3.1.	Souches métaboliquement actives dans le sol.....	51
3.2.	Populations fongiques totales.....	52
3.3.	Caractérisation de la mycothèque	54
	Conclusion partielle	60

Introduction

Du fait de l'importance des paramètres physico-chimiques du sol dans les processus de dépollution et de l'intérêt d'utiliser des souches provenant de sols historiquement contaminés pour le développement de méthodes de bioremédiation, ce chapitre décrit l'obtention et la caractérisation d'échantillons de sols provenant de différents sites industriels, ainsi que l'isolement de souches fongiques. La collection fongique ou mycothèque obtenue est ensuite caractérisée d'un point de vue morphologique et les souches les plus intéressantes sont identifiées génétiquement par des méthodes de biologie moléculaire.

Des échantillons de sol sont prélevés sur différents sites industriels présentant potentiellement des contaminations historiques en HAP. Deux de ces sites se trouvent au sein du site atelier de l'Union près de Roubaix, un autre dans la zone de Dunkerque et un dernier près de Chambly en Picardie. Les prélèvements au niveau du site de l'Union sont réalisés dans le cadre d'une convention tripartite entre la Société d'Economie Mixte Ville Renouvelée responsable du réaménagement du site, le Groupement d'Intérêt Scientifique Sites, Sols et Sédiments Pollués (GIS3SP) coordinateur scientifique du site atelier et l'ULCO. L'origine des sols de Dunkerque est confidentielle. Les échantillons du site de Moulin Neuf près de Chambly sont fournis gracieusement par la Société Nationale des Chemins de fer Français (SNCF).

Une étape de documentation sur ces sites permet de réunir des informations sur les origines potentielles de contaminations en hydrocarbures et des données géologiques. Les échantillons sont ensuite caractérisés pour leurs teneurs réelles en HAP et certains d'entre eux, sélectionnés selon leur contamination, sont étudiés du point de vue pédologique. L'humidité étant un paramètre important pour la biodisponibilité des contaminants, les propriétés de rétention hydrique de ces échantillons sont également étudiées. Enfin l'isolement de souches fongiques est réalisé à partir de sept échantillons choisis selon leur diversité de contamination et de texture. La mycothèque obtenue est caractérisée macroscopiquement et certaines souches sont identifiées génétiquement. Le tableau I 1 résume ces étapes d'analyse successives (voir aussi page volante).

Tableau I 1: Etapes d'analyse des échantillons de sol

Origine	Roubaix (dépôt de bus)													Dunkerque		Roubaix (usine à gaz)									Chambly
Echantillon	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	B1	B2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	D
Profil HAP	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Pédologie	✓		✓									✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Rétention hydrique	✓		✓									✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Isolements	✓											✓			✓		✓					✓		✓	✓

Matériels et méthodes

1. Produits chimiques

1.1. Solvant

Le dichlorométhane (qualité HPLC) utilisé pour l'extraction des HAP est obtenu auprès de Fisher Scientific SAS (Illkirch Cedex, France).

1.2. Antibiotiques

Le Rose Bengal (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) est utilisé pour ralentir le développement bactérien. Le chloramphénicol (Acros Organics, Noisy-Le-Grand, France) est un antibiotique inclus dans les milieux solides à l'extrait de malt (Malt Extract Agar, MEA) lors des premières phases de purification des souches par repiquage.

2. Recherche d'informations sur les sites d'étude

Les cartes géologiques présentées sont obtenues par utilisation de l'outil "infoterre" du site du Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM, 2013). Des données sur les propriétés physico-chimiques des sols des régions étudiées ont été obtenues par utilisation de l'outil cartographique de la Base de Données Analyse des Terres (BDAT, GISSOL, INRA, 2013). Les données concernant les historiques de contamination sont fournies par les opérateurs des sites ou obtenues par la consultation de sources documentaires telles que les fiches BASOL et BASIAS.

3. Prélèvement et analyses physico-chimiques des échantillons de sol

3.1. Conditions d'échantillonnage

Les 13 échantillons du site de l'ancien dépôt de bus sont prélevés de façon mécanique par l'enfoncement de liners en plexiglas ou par tarière lors d'une campagne de caractérisation

du site réalisée par l'entreprise Geosan (Cuincy, France) pour le compte du bureau d'étude Burgeap (Arras, France) et de l'Etablissement Public Foncier Nord-Pas-de-Calais (EPF, Lille, France). Les 12 autres échantillons sont prélevés à la tarière manuelle. Chaque échantillon est placé en sac plastique dont l'air est chassé avant fermeture.

3.2. Conservation des échantillons

Une partie de chaque échantillon de sol est conservée à 4°C pour la réalisation des isolements de souches fongiques. Le reste destiné aux caractérisations abiotiques est séché une semaine sous hotte chimique avec homogénéisation régulière avant conservation à température ambiante.

3.3. Caractérisation pédologique des échantillons

L'analyse des paramètres pédologiques des échantillons de sol a été réalisée par le Laboratoire d'Analyses des Sols d'Arras (LAS, INRA, Arras, France). Les paramètres étudiés sont les suivants: la granulométrie mesurée d'après la norme NF X 31-107, les teneurs en carbone organique et azote total selon les normes NF ISO 10694 et 13878, le pH selon la norme NF ISO 10390 et les capacités d'échanges cationiques selon la norme NF X 31-130.

3.4. Rétention hydrique des échantillons de sol

Les teneurs hydriques des échantillons à un potentiel de -150 hPa sont mesurées au sein du laboratoire "Interactions entre xénobiotiques organiques et systèmes sol-plante" (Institut d'Ecologie des Sols, Helmholtz Zentrum, Munich, Allemagne) sur la base de la méthode décrite par Hartge et Horn (1989) avec les modifications suivantes. Les sols séchés et tamisés à 2 mm sont compressés dans des anneaux métalliques (10 cm³) à une densité de 1,3 g.cm⁻³ et saturés en eau bidistillée. Une boîte à kaolin (08.02, Eijkelkamp, Pays-Bas) est ensuite utilisée pour soumettre les échantillons à une sous-pression de -150 hPa correspondant au potentiel hydrique étudié. Après équilibrage des échantillons jusqu'à stabilisation de leur masse, les teneurs hydriques sont déterminées par pesée et comparaison aux masses sèches obtenues après 24h en étuve (100°C). Quatre répliquats sont réalisés par échantillon.

3.5. Mesure des contaminations en HAP

Le traitement des échantillons de sol préliminaire à l'extraction des HAP pour leur dosage est réalisé au sein du Centre Commun de Mesures de Dunkerque (CCM, France) et

suit la norme NF ISO 11464. Il comprend le séchage des échantillons une semaine sous hotte chimique, leur homogénéisation par mélange, le tamisage à 2 mm et le broyage mécanique de la fraction supérieure à cette taille (broyeuse électrique Ika M20, 5 min). Une quantité de 20 g du mélange des fractions tamisée et broyée est utilisée pour l'extraction par l'appareil de Soxhlet des HAP avec 175 mL de dichlorométhane pendant 17h. Les extraits sont concentrés sous flux d'azote à 1 mL ou à 100 mL selon leur intensité de coloration puis dosés en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS Triple quadripôle - GC : Varian 3800 / MS : Varian 1200). Le volume injecté est de 1 μ L, l'injecteur est réglé en mode splitless à une température de 295°C puis le gradient de température de la colonne est le suivant : 70°C pendant 2 min, 30°C.min⁻¹ jusque 150°C, 5°C.min⁻¹ jusque 200°C, 4°C.min⁻¹ jusque 310°C pendant 18 min. L'ionisation se fait par impact électronique à 70 eV avec une température de la source de 300°C et le détecteur fonctionne en mode scan entre 50 et 500 unités de masse atomique.

4. Isolement de souches fongiques

Sept échantillons de sol sélectionnés d'après leur diversité de paramètres abiotiques sont utilisés afin de constituer une mycothèque.

4.1. Milieux de culture

Le MEA est un milieu solide riche composé d'agar à l'extrait de malt:

Extrait de malt (Fluka Analytical)	20 g.L ⁻¹
Extrait de levure (Fisher Scientific)	2 g.L ⁻¹
Agar (Fisher Scientific)	15 g.L ⁻¹
qsp eau distillée	

Le milieu modifié à partir de Chesters et Thornton (1956) est le suivant :

Glucose	10 g.L ⁻¹
Bouillon nutritif	5 g.L ⁻¹
NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	1,015 g.L ⁻¹
KCl	0,544 g.L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g.L ⁻¹

Agar (Fisher Scientific)	20 g.L ⁻¹
Rose Bengal	66,67 mg.L ⁻¹
qsp eau courante	

4.2. Méthodes d'isolement

Il est connu que chaque méthode d'isolement va influencer la composition des populations fongiques isolées (Chesters et Thornton, 1956). De ce fait, deux techniques sont utilisées dans notre étude pour la constitution de la mycothèque (figure I 1). La méthode d'inoculation directe décrite par Waksman (1916) permet d'isoler des souches métaboliquement actives dans le sol tandis que la méthode de suspension/dilution est décrite pour favoriser l'isolement des souches sporulantes (Chesters et Thornton, 1956 ; Johansson, 2001). Rappelons que l'objectif premier de ces isolements est de constituer une collection de souches fongiques afin d'étudier leur potentiel de bioremédiation des HAP et non d'effectuer un inventaire exhaustif de la diversité des micromycètes.

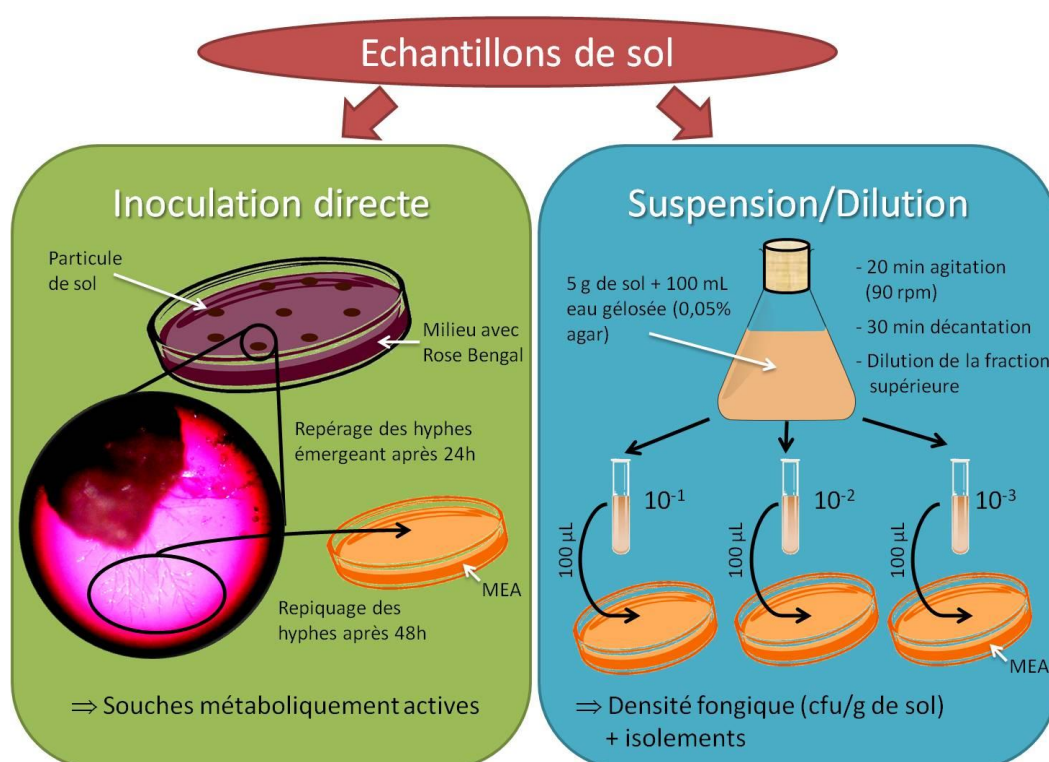


Figure I 1: Techniques d'isolement employées dans la constitution de la mycothèque

La méthode d'inoculation directe (Waksman, 1916) consiste à placer des particules de sol sur un milieu gélosé contenant du Rose Bengal, puis de repérer sous loupe binoculaire (Motic Microscopes, VWR, Pessac, France) les hyphes qui en émergent 24 h plus tard. Les hyphes repérés sont ensuite prélevés au micro-scalpel 48h après le début de l'incubation pour

être transplantés sur des milieux neufs. Cette durée d'incubation permet au manipulateur d'exciser plus aisément les apex des hyphes sans entrer en contact avec leur particule d'origine.

Le milieu utilisé pour le dépôt des particules de sol dans notre étude est modifié à partir de celui développé par Chesters et Thornton (1956). Ce milieu est choisi pour sa richesse modérée en éléments nutritifs qui favorise les hyphes émergeant des particules de sol et le Rose Bengal qui ralentit le développement bactérien. Les particules de sol utilisées sont sélectionnées avec un diamètre inférieur à 1 mm dans le cadre de notre étude. L'incubation de 48h avant repiquage a lieu dans l'obscurité à 22°C. Les milieux neufs où les hyphes sont transplantés sont des milieux riches MEA (Malt Extract Agar) avec 120 mg.L⁻¹ de chloramphénicol.

La méthode de suspension/dilution a été adaptée par les mycologistes des sols à partir d'une technique utilisée pour l'isolement général et l'étude des bactéries telluriques (Waksman, 1927). Le protocole utilisé dans notre étude consiste à mettre en suspension 5 g de sol (équivalent masse sèche) dans 100 mL d'eau gélosée (0,05 % en agar) par 20 min d'agitation à 90 rpm, de laisser décanter 30 min et d'effectuer trois dilutions au dixième. 100 µL de chacune des dilutions (10⁻¹, 10⁻² et 10⁻³) sont alors étalés sur milieu solide (MEA + 200 mg.L⁻¹ de chloramphénicol) en triple exemplaire. Les cultures sont ensuite incubées à 22°C et sous une photopériode de 12h/12h. Cette méthode permet d'effectuer une mesure des densités de population fongique par comptage des colonies après 6 jours d'incubation. Les dénombrements de colonies sont rapportés au volume utilisé pour l'inoculation (100 µL) puis la dilution utilisée pour le comptage est prise en compte. Le nombre de CFU (Colony-Forming Unit) est alors calculé pour le volume total de suspension (100 mL) et ramené à la masse de sol utilisée (5 g d'équivalent masse sèche). La moyenne et l'écart type de chaque triplicata sont calculés. Cette technique permet également de compléter la collection d'isolats par purification de souches fongiques via des repiquages successifs.

4.3. Technique d'identification

La caractérisation morphologique consiste en l'observation macroscopique de l'apparence et de la vitesse de croissance des colonies sur MEA et en l'observation microscopique des mycéliums au stéréomicroscope et en contraste de phase. L'analyse moléculaire se fait par séquençage des zones ITS de l'ADN ribosomal complétée si nécessaire

par le séquençage du gène codant pour le facteur d'élongation ou pour la bêta tubuline. Ces analyses sont réalisées par le BCCMTM/MUCL (Mycothèque de l'Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgique) et par le laboratoire "Ecologie du Système Plante-Sol/Mycologie" de l'Institut d'Ecologie des Sols (Helmholtz Zentrum, Munich, Allemagne).

5. Traitements mathématiques

Chaque mesure menée en réplicata est représentée sous la forme de moyennes et de leurs écarts-types. La significativité statistique des différences entre les moyennes est calculée par le test-t non apparié de Student et représentée sous la forme de lettres distinguant les groupes statistiquement différents.

Résultats et Discussion

1. Informations sur les sites d'études

La présentation des sites d'études résulte des informations fournies par les partenaires et opérateurs de chacun des sites, ainsi que de recherches bibliographiques à partir de différents fonds documentaires.

1.1. Site de l'Union (Roubaix)

Le site atelier de l'Union représente 80 hectares de friches industrielles situées entre les villes de Roubaix, Tourcoing et Wattrelos sur le versant nord-est de la métropole lilloise dans le département du Nord (France). Ce site est identifié depuis 1992 en tant que Grand Projet d'Excellence Métropolitain du fait de son accessibilité et de sa proximité avec la Belgique qui le rendent attractif pour le développement d'un centre tertiaire (POPSU, 2008). Il est en cours de réaménagement depuis 2007 pour une durée de 15 ans par la Société d'Economie Mixte (SEM) Ville Renouvelée dans le cadre d'un projet de renouvellement urbain intégrant logements, activités économiques et équipements. La mise en sécurité des infrastructures restantes est gérée par l'Etablissement Public Foncier (EPF) Nord-Pas-de-Calais en tant que maître d'œuvre. La construction de 1400 logements, d'un éco-quartier et le développement d'un pôle d'excellence économique orienté sur l'image, les médias (Pôle image Descat) et les textiles innovants (Centre Européen des Textiles Innovants, CETI) sont en effet en cours. Ces infrastructures permettront à terme l'accueil de 4 000 salariés et de 3 000 habitants. La zone de l'Union fait aujourd'hui partie du réseau SAFIR (Sites Ateliers Français pour l'Innovation et la Recherche) développé conjointement en 2011 par le Groupement d'Intérêt Scientifique

sur les Friches Industrielles (GISFI), le Groupement d'Intérêt Scientifique Sites, Sols et Sédiments Pollués (GIS3SP), l'Institut Supérieur d'Agriculture (ISA), l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de St-Etienne (ENSM-SE), l'Association Pour l'Environnement et la Sécurité en Aquitaine (APESA) et l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME). Le GIS3SP qui coordonne l'accès scientifique au site, a été constitué en 2007 et regroupe depuis 2010 l'Ecole des Mines de Douai, le BRGM, le Centre Terre et Pierre, l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), l'Institut Scientifique de Service Public (ISSeP), l'Université de Lille 1 et l'Université de Mons. Le réseau SAFIR constitue un dispositif de support opérationnel en recherche et développement pour la gestion des sols, et l'appartenance de la zone de l'Union à ce réseau facilite l'accueil de projets R&D collaboratifs de disciplines variées durant la phase de réaménagement du site (GIS3SP, 2013).

Du point de vue géologique (figure I 2), le site de l'Union est compris dans une zone où des limons des plateaux du Pléistocène (Quaternaire) surmontent des Argiles d'Orchies de l'Yprésien (Tertiaire). Cependant un forage réalisé en 1963 dans la zone montre l'influence anthropique sur le profil géologique de cette zone avec des remblais sur les 2 premiers mètres avant de trouver les alluvions limono-sableuses du Quaternaire jusqu'à environ 12 m puis les argiles d'Orchies.

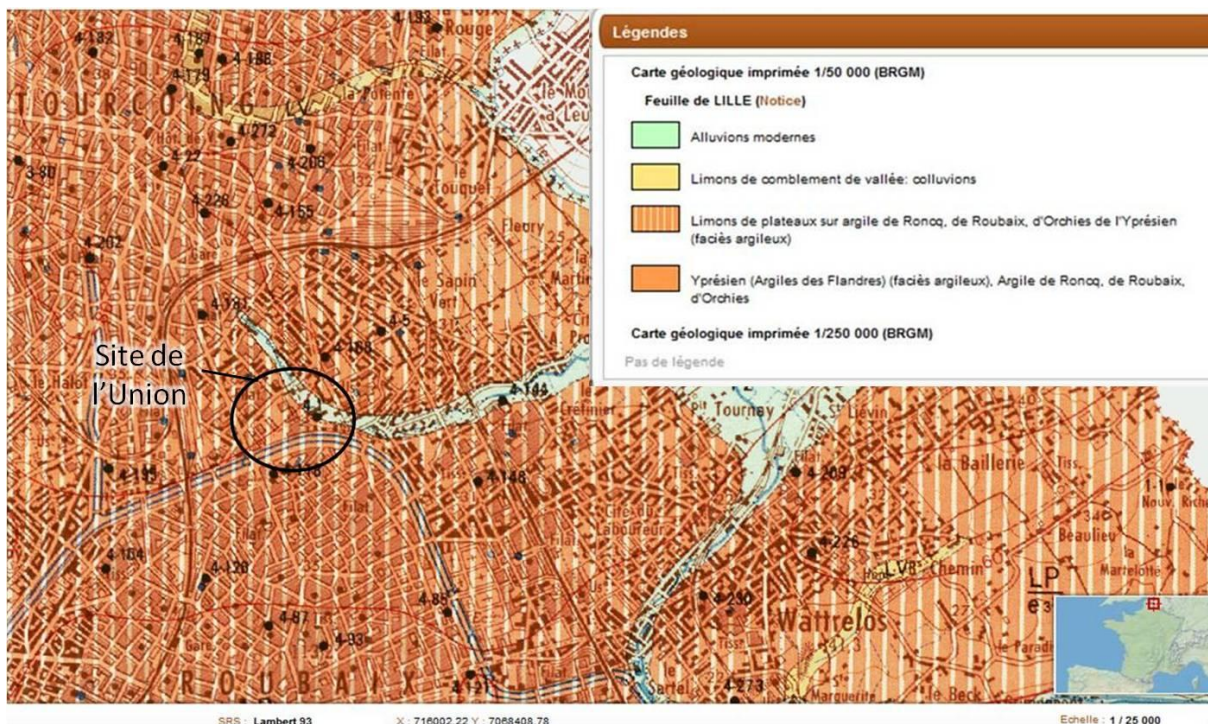


Figure I 2: Fond géologique du site atelier de l'Union (Echelle 1/25 000 ; Infoterre, BRGM, 2013)

En concordance avec le fond géologique, la carte pédologique de la figure I 3 confirme la nature limoneuse des sols de la zone de Roubaix avec des néoluvisols et luvisols de limons éoliens sur substrat crayeux.

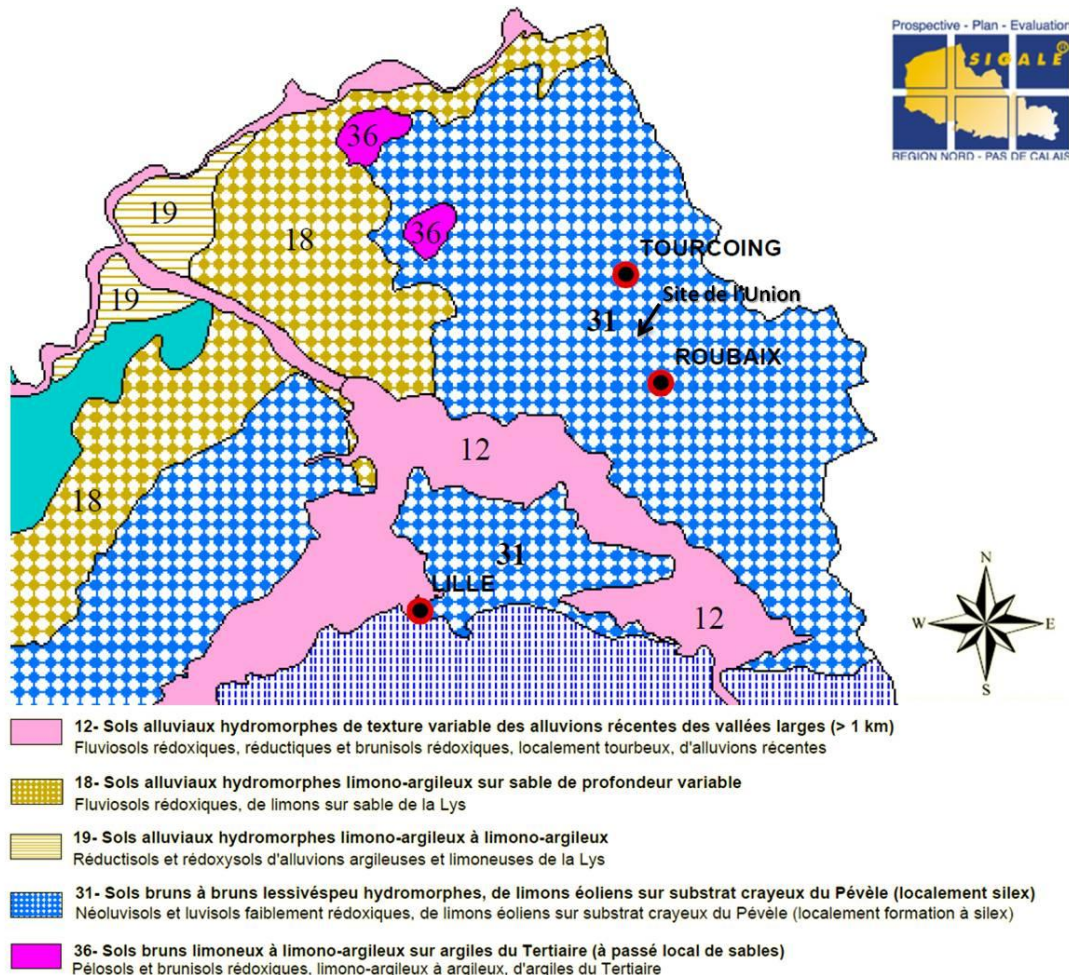


Figure I 3: Localisation du site de l'Union sur la carte pédologique de la région de Roubaix (échelle 1/50 000 ; extrait de la carte des pédopaysages ; sources : Région Nord-Pas-de-Calais, Ministère de l'Agriculture, DRAF-SRHA-Mission Sol-2000)

Selon la classification française des sols (CPCS, 1967), la description en tant que sol brun indique une migration nulle ou très faible de l'argile et la dénomination "brun lessivé" indique un horizon éluvial peu différencié, un horizon B textural net et un humus de type mull. Les échantillons de notre étude concernent cependant des sols fortement anthropisés dont la structure a été dénaturée par des activités industrielles successives.

L'histoire industrielle du site de l'Union débute à la fin du XIX^{ème} siècle avec la construction du canal de Roubaix (1861-1876) qui offrait une voie d'eau pour acheminer les matières premières, emmener les produits finis et approvisionner les machines à vapeurs. Ce fut l'opportunité pour les ateliers de filature (la Tossée) de s'étendre hors des centres villes dès

1870, rejoints à partir de 1890 par des brasseries qui deviendront la Grande Brasserie Moderne (GBM) puis Terken. Ce n'est qu'au début du XX^{ème} siècle que viendront s'installer des activités de type industrie pétrochimique et métallurgique, usine à gaz ou dépôt de bus. Les échantillonnages réalisés dans le cadre du projet de thèse concernent les parcelles dévolues à ces deux derniers types d'activité. Comme le montre la figure I 4, le site de l'Union est divisé en parcelles d'après les derniers exploitants. Les sites de l'ancien dépôt de bus et de l'ancienne usine à gaz se situent au sein de la parcelle "Terken".

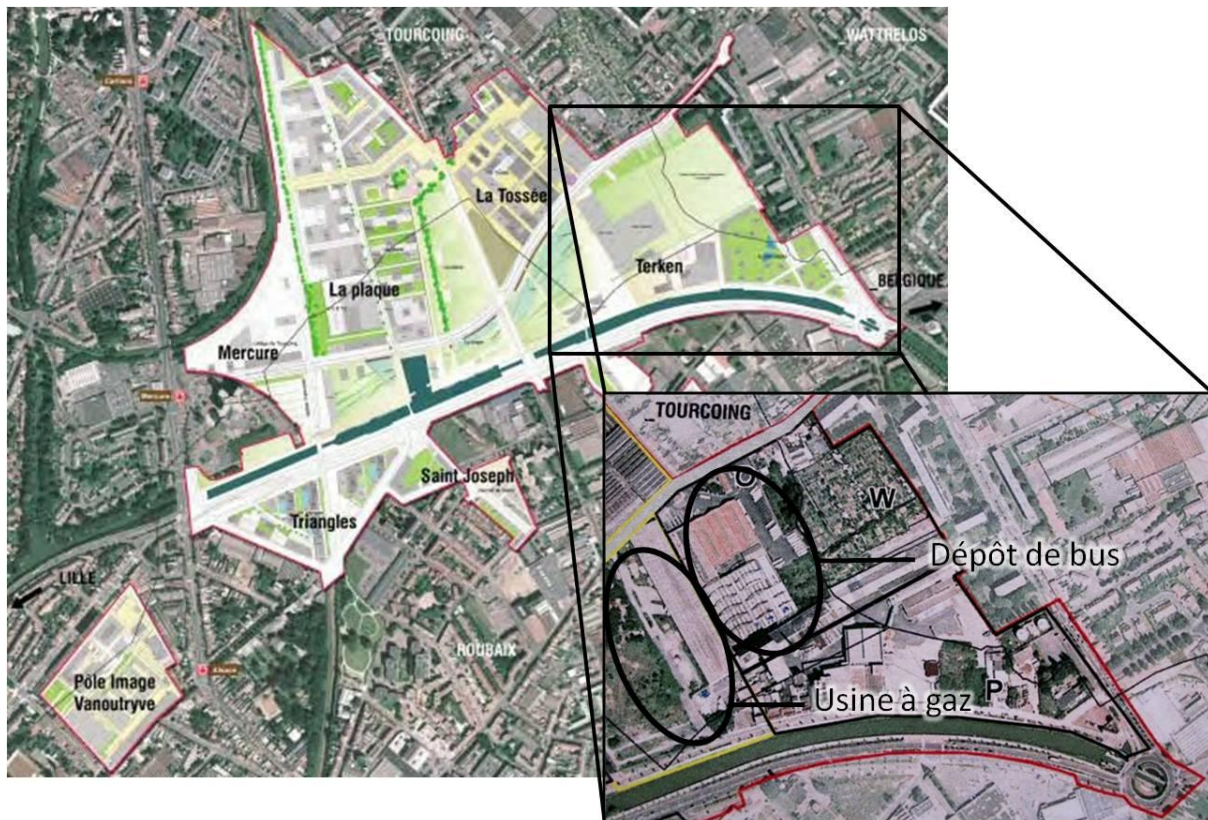


Figure I 4: Positionnement géographique des sites d'échantillonnage au niveau du site atelier de l'Union (Echelle 1/10 000, Zoom × 2 ; Source : GIS3SP)

1.1.1. Dépôt de bus (site A)

Le site de l'ancien dépôt de bus sera nommé site A dans la suite de notre étude. Les échantillonnages s'y sont déroulés en Juin-Juillet 2011 à l'occasion d'une campagne de mesures réalisée par Geosan pour le bureau d'étude Burgeap et l'EPF Nord-Pas-de-Calais. Ce terrain exploité successivement par les sociétés ELRT (l'Electricité de Lille / Roubaix / Tourcoing) puis Transpole a accueilli de 1930 à 2006 un dépôt de tramways et d'autobus servant également à l'approvisionnement en carburant et à l'entretien. Les données fournies par le GIS3SP sur les contaminations de ce site sont issues d'analyses préliminaires au

réaménagement de la zone. Elles révèlent des contaminations en HAP et localement en trichloroéthylène (TCE). Les teneurs en éléments traces métalliques (ETM), Polychlorobiphényles (PCB), Benzène, Toluène, Ethylbenzène et Xylène (BTEX) sont faibles à nulles. Les sources potentielles de pollution aux HAP repérées sur ce site sont les cuves de vidange et la citerne à diesel. Ces informations ont permis le positionnement des points d'échantillonnage. Le tableau I 2 présente ce positionnement par rapport aux sources potentielles de contamination en HAP et les profondeurs d'échantillonnage.

Tableau I 2: Positionnement et profondeur des échantillonnages au niveau du dépôt de bus du site de l'Union

Echantillon	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13
Position	Extérieur bâtiment	Extérieur bâtiment	Intérieur bâtiment	Intérieur bâtiment	Citerne diesel	Cuve vidange	Cuve vidange	Aval nappe	Aval nappe	Parking	Parking	Amont nappe	Amont nappe
Profondeur	50 cm – 2 m	2 m – 3 m	50 cm – 2 m	2 m – 5 m	50 cm – 3 m	50 cm – 2 m	2 m – 6 m	50 cm – 2 m	2 m – 6 m	50 cm – 2 m	2 m – 5 m	50 cm – 2 m	2 m – 3 m

Le positionnement des points d'échantillonnage a été fixé dans le but de représenter la variabilité de contamination en HAP du site. Les échantillons sont ainsi prélevés à l'extérieur du bâtiment, à proximité de points d'échantillonnages antérieurs ayant présenté des contaminations en HAP, près de la citerne de stockage du diesel, au niveau du parking de bus et aux alentours des cuves vidange en tenant compte du sens d'écoulement de la nappe. La profondeur maximale d'échantillonnage est déterminée selon la saturation en eau du sol.

1.1.2. Usine à gaz (site C)

La seconde parcelle ayant servi aux échantillonnages sur le site de l'Union est celle de l'ancienne usine à gaz qui sera nommée site C dans le reste de notre étude du fait de son échantillonnage en troisième position d'un point de vue chronologique (Janvier-Février 2012). L'usine à gaz a été en activité de 1878 à 1958 sous la gestion de la CIE (Compagnie Industrielle d'Eclairage) puis de GDF (Gaz de France) d'abord pour la production de gaz puis seulement sa compression à partir de 1953. Après l'arrêt de l'usine à gaz en 1958, la parcelle fut employée par la Brasserie Terken principalement en tant que site d'entreposage (figure I 5).

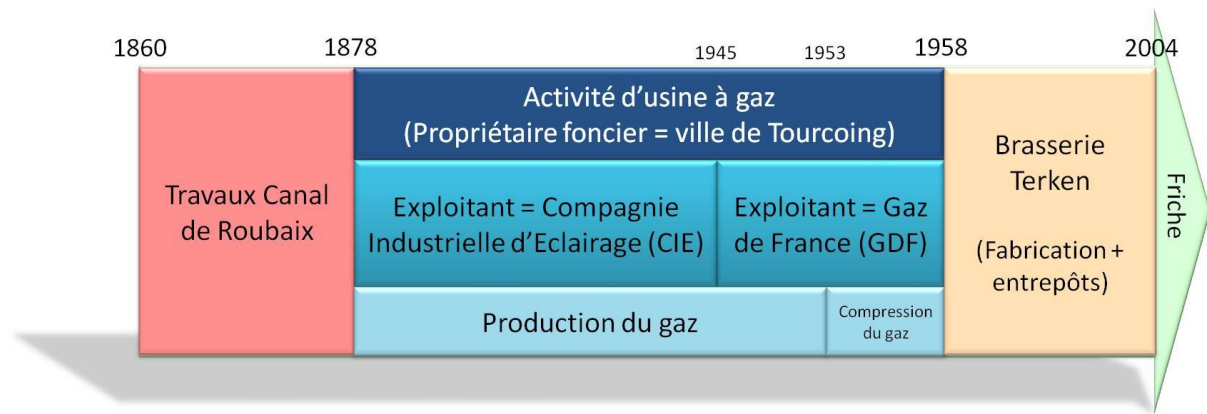


Figure I 5: Historique de l'exploitation du site de l'usine à gaz sur la zone de l'Union

Selon les fiches BASOL et BASIAS, l'activité de l'usine à gaz aurait généré des contaminations des sols par des goudrons contenant des ferrocyanures. Pour permettre le réaménagement de la zone, les terres de ce site ont été excavées par l'entreprise Envisan (Lille, France) avant leur traitement par procédé thermique.

Les neuf échantillons de notre étude ont été prélevés d'une part dans la couche superficielle de sol recouvrant le site après son excavation (échantillons C1-C6) et d'autre part dans les sols extraits de l'intérieur des anciens gazomètres (C7-C9). Du fait de l'excavation des sols avant nos prélèvements à la tarière, aucune information n'est disponible sur la profondeur d'origine des échantillons.

1.2. Site de Dunkerque (site B)

Les deux échantillons du site de Dunkerque (Nord-Pas-de-Calais, France) appelé site B dans notre étude ont été obtenus en Janvier 2012. Pour des raisons de confidentialité, l'origine de la contamination ne peut être précisée. Les sols échantillonnés ont une origine sédimentaire comme l'indique le fond géologique de cette zone géographique (Annexe 1). La carte géologique montre en effet que les affleurements de la zone de Dunkerque sont constitués de dunes et de cordons limono-sableux récents.

De façon concordante, la carte pédologique de la figure I 6 indique des sols calcaires sableux et alluviaux limono-argileux au niveau de Dunkerque et de ses environs.

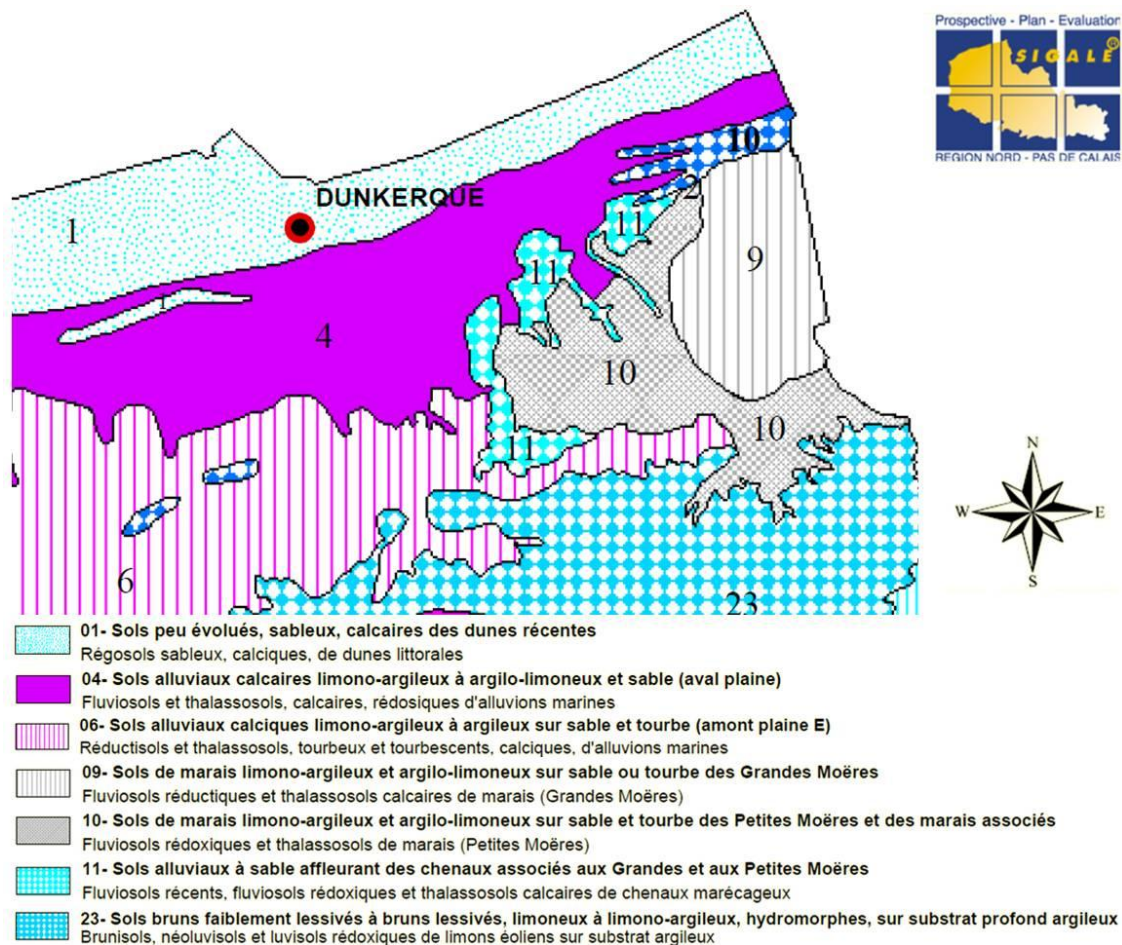


Figure I 6: Carte pédologique de la région de Dunkerque (échelle 1/50 000 ; extrait de la carte des pédopaysages ; sources : Région Nord-Pas-de-Calais, Ministère de l'Agriculture, DRAF-SRHA-Mission Sol-2000)

1.3. Site de Moulin Neuf (site D)

Le site de Moulin Neuf situé près de Chambly en Picardie (France) a accueilli un atelier de créosotage des traverses de voie de chemin de fer jusqu'en l'an 2000. La créosote est une huile riche en HAP extraite à partir du goudron de houille et longtemps autorisée pour la conservation du bois du fait de ses propriétés pesticides. Du fait de ses effets cancérigènes, la vente de bois créosotés a été interdite par l'Union Européenne en 2001 (directive 2001/90/EC).

La carte géologique (figure I 7) montre que la région du site de Moulin Neuf repose sur des alluvions et des limons.

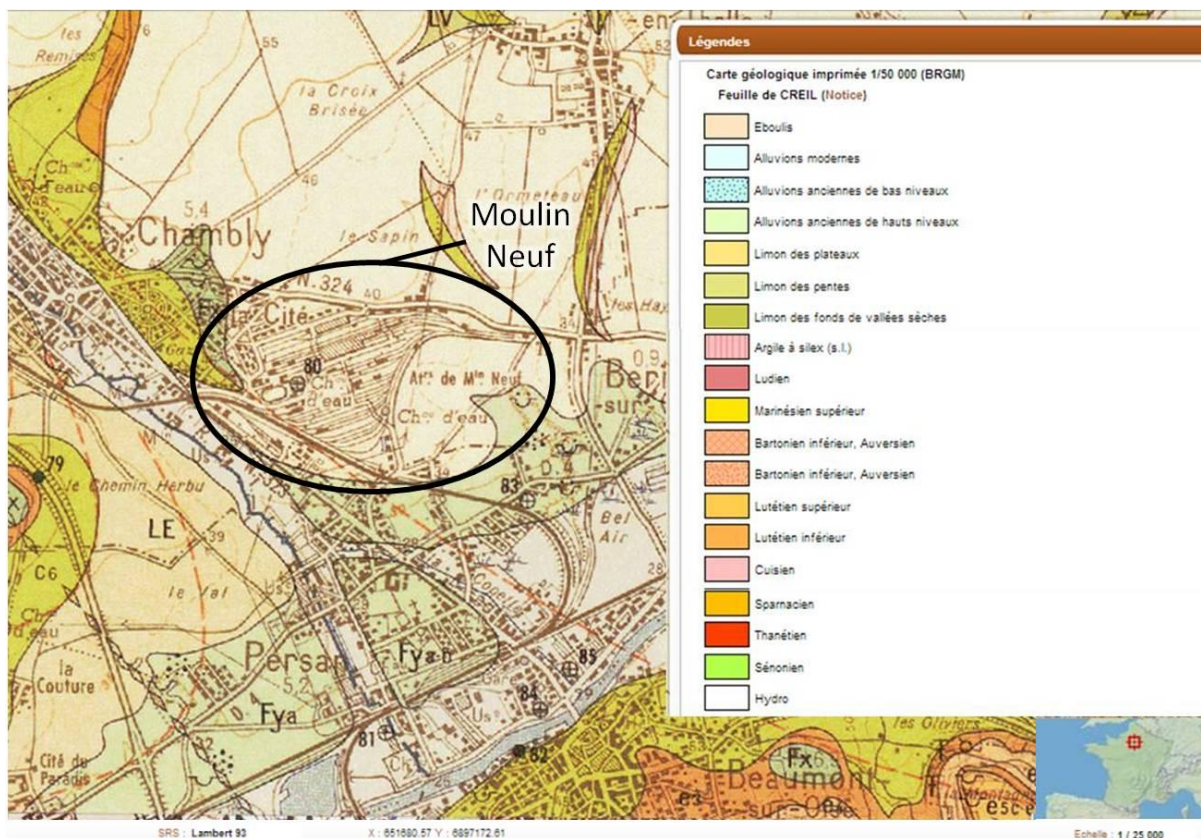


Figure I 7: Carte géologique de la ville de Chambly (échelle 1/25 000 ; Infoterre, BRGM, 2013)

De fait, le profil géologique de ce site est constitué d'une couche de remblais limono-sableux à graviers jusqu'à une profondeur de 1,5 m puis de limons et limons-sableux bruns jusque 8-9 m et de la craie blanche altérée au-delà de cette profondeur. Le niveau de la nappe régionale de la craie est situé entre 9 et 10 m.

La figure I 8 résume l'historique de ce site industriel (Lecoeur, 1999).

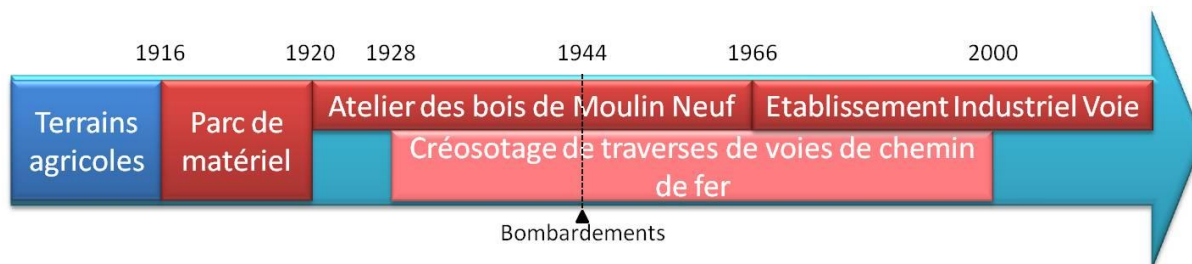


Figure I 8: Historique de l'exploitation du site de Moulin Neuf

L'histoire du site débute durant la première guerre mondiale en 1916 avec la création par le génie militaire français d'un parc de stockage et de montage de matériel destiné à réparer les voies stratégiques de l'arrière front. Un début d'atelier est créé dès 1917 puis un atelier magasin en 1918 par la compagnie du Nord, mais l'atelier des bois de Moulin Neuf ne

s'établit véritablement que vers 1920. L'activité de créosotage de traverses de chemin de fer débute en 1928 avec l'autorisation d'installer des réservoirs aériens de stockage de créosote (décision ministérielle n°CF2-200). En 1938, le réseau ferré français est regroupé au sein de la Société Nationale des Chemins de fer Français (SNCF) qui est encore le propriétaire actuel du site. Au cours de la seconde guerre mondiale en 1944, les installations sont détruites à 70% par trois bombardements alliés consécutifs. Depuis 1966, le site s'appelle l'Etablissement Industriel Voie (E.I.V.) de Moulin Neuf. L'activité de créosotage cesse en 2000, mais l'E.I.V. de Moulin Neuf continue à ce jour de fournir bois, rails et appareils de voie aux Etablissements Equipement pour la maintenance, le renouvellement ou l'installation de voies ferrées.

Du fait de son histoire industrielle et notamment des destructions subies, le site présente des contaminations du sol au gasoil et à la créosote sur une surface de 6 000 m² à une profondeur d'environ 10 m.

2. Analyses physico-chimiques des échantillons de sol

Les différentes campagnes d'échantillonnage ont permis d'obtenir les 25. Du fait de la variabilité possible des sols au niveau d'une même zone de prélèvement, la caractérisation physico-chimique se fait directement au niveau des échantillons. Outre les niveaux de contamination en HAP, les échantillons de sol sont également caractérisés d'un point de vue pédologique. En effet, les propriétés des sols peuvent fortement affecter la biodégradation des hydrocarbures par les conditions de croissance qu'elles offrent aux microorganismes ou par l'influence de leurs propriétés physicochimiques sur la biodisponibilité de ces xénobiotiques (Haritash et Kaushik, 2009).

2.1. Analyse des contaminations en HAP

Les contaminations n'étant pas homogènes sur un site, les profils de contamination en HAP doivent être analysés directement dans les échantillons de sols industriels prélevés. La figure I 9 permet de comparer les teneurs en HAP totaux et par classe de HAP. Rappelons que la classe des 2 et 3 cycles regroupe : le NAPH, l'ACYL, l'ACE, le FLU, le PHEN et l'ANT, celle des 4 cycles : le FLA, le PYR, le BaA et le CHR, et celle des 5 et 6 cycles : le BbF, le BkF, le BaP, le DBA, l'IP et le BghiP.

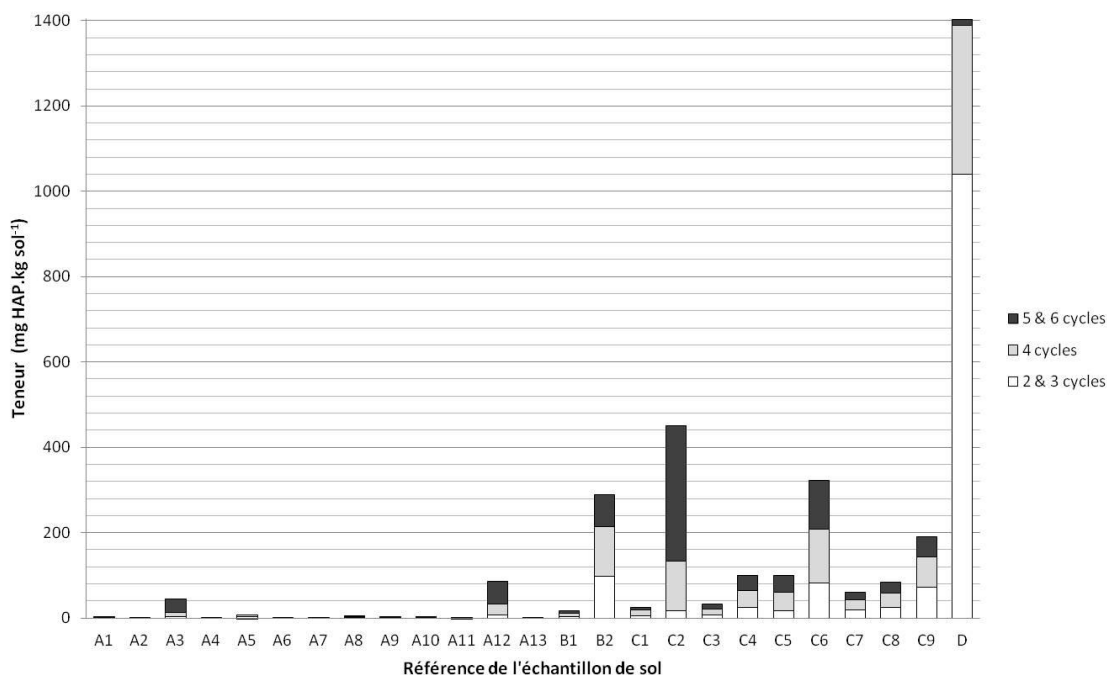
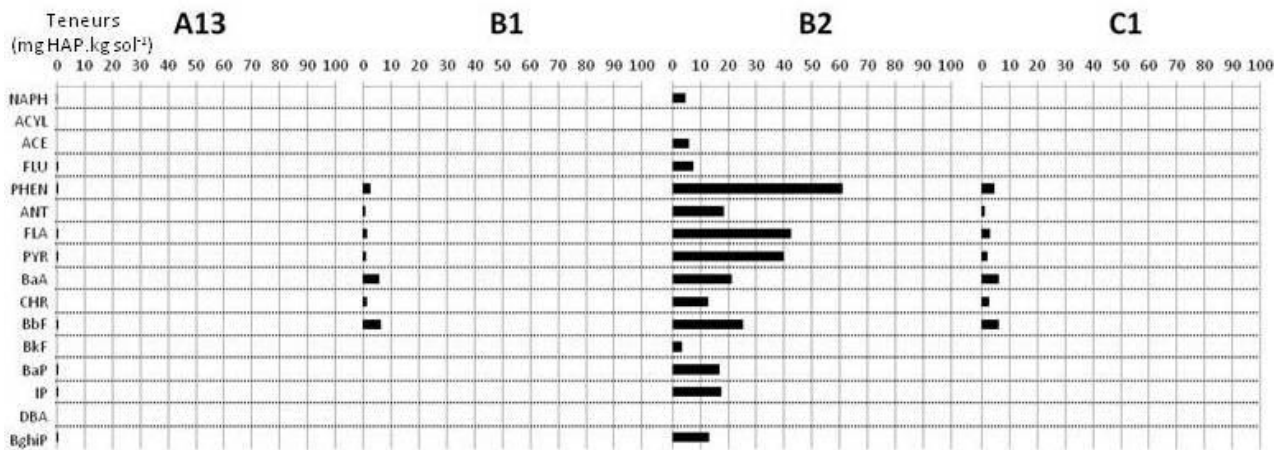
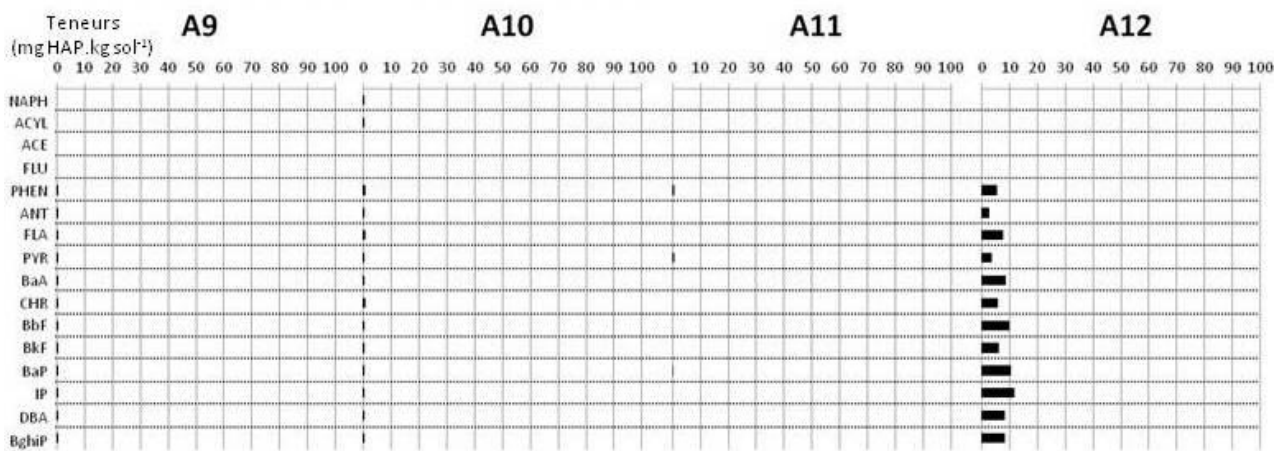
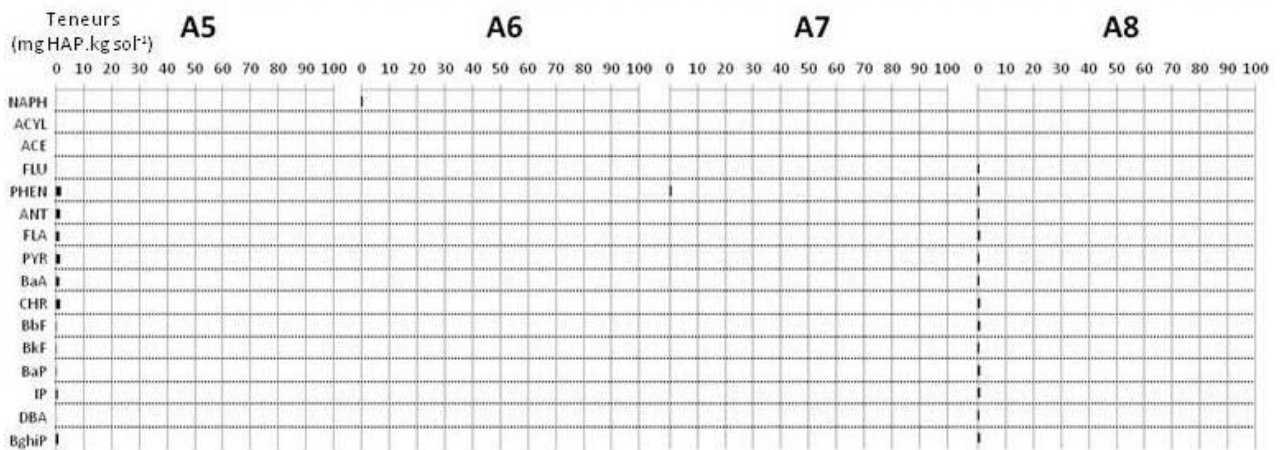
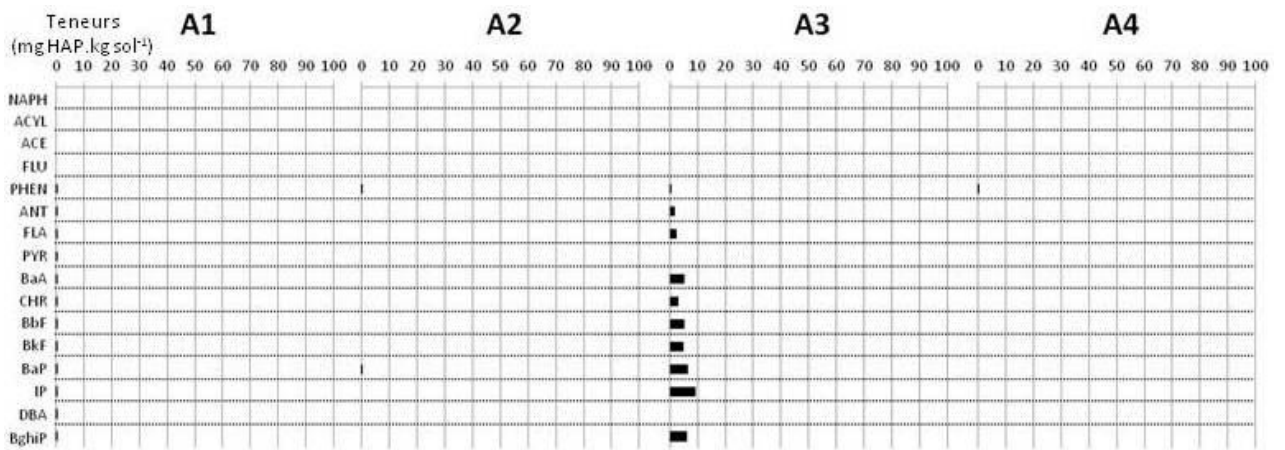


Figure I 9: Contaminations en HAP totaux et proportion des HAP de la liste US EPA répartis par classe

La figure I 9 montre que les contaminations en HAP totaux mesurées sur le site A sont extrêmement faibles mis à part pour les échantillons A3 et A12 avec des teneurs de 44 et 87 mg.kg⁻¹ respectivement. Le site B présente un échantillon avec une teneur faible en HAP totaux (B1, 11,5 mg.kg⁻¹) et un échantillon avec une teneur plus élevée de 289 mg.kg⁻¹ (B2). Le site C comprend des échantillons avec des teneurs faibles (de 24 à 99 mg.kg⁻¹) du même ordre que celles de A3 et A12 (C1, C3, C4, C5, C7 et C8) et de teneurs un peu plus élevées (190 à 451 mg.kg⁻¹) de l'ordre de l'échantillon B2 (C2, C6 et C9). Cette représentation graphique souligne également le profil particulier de l'échantillon C2 dominé par les HAP de hautes masses molaires. Les teneurs en HAP totaux mesurées dans les sols provenant de l'intérieur des gazomètres (C7-C9) ne dépassent pas celles des sols de la couche superficielle du site (C1-C6). Cet histogramme montre également la teneur en HAP totaux beaucoup plus élevée dans l'échantillon D (1402 mg.kg⁻¹) que dans l'ensemble des autres échantillons et la dominance de son profil par les HAP légers. La figure I 10 présente plus précisément les profils des 16 HAP de la liste des polluants prioritaires de l'US EPA.



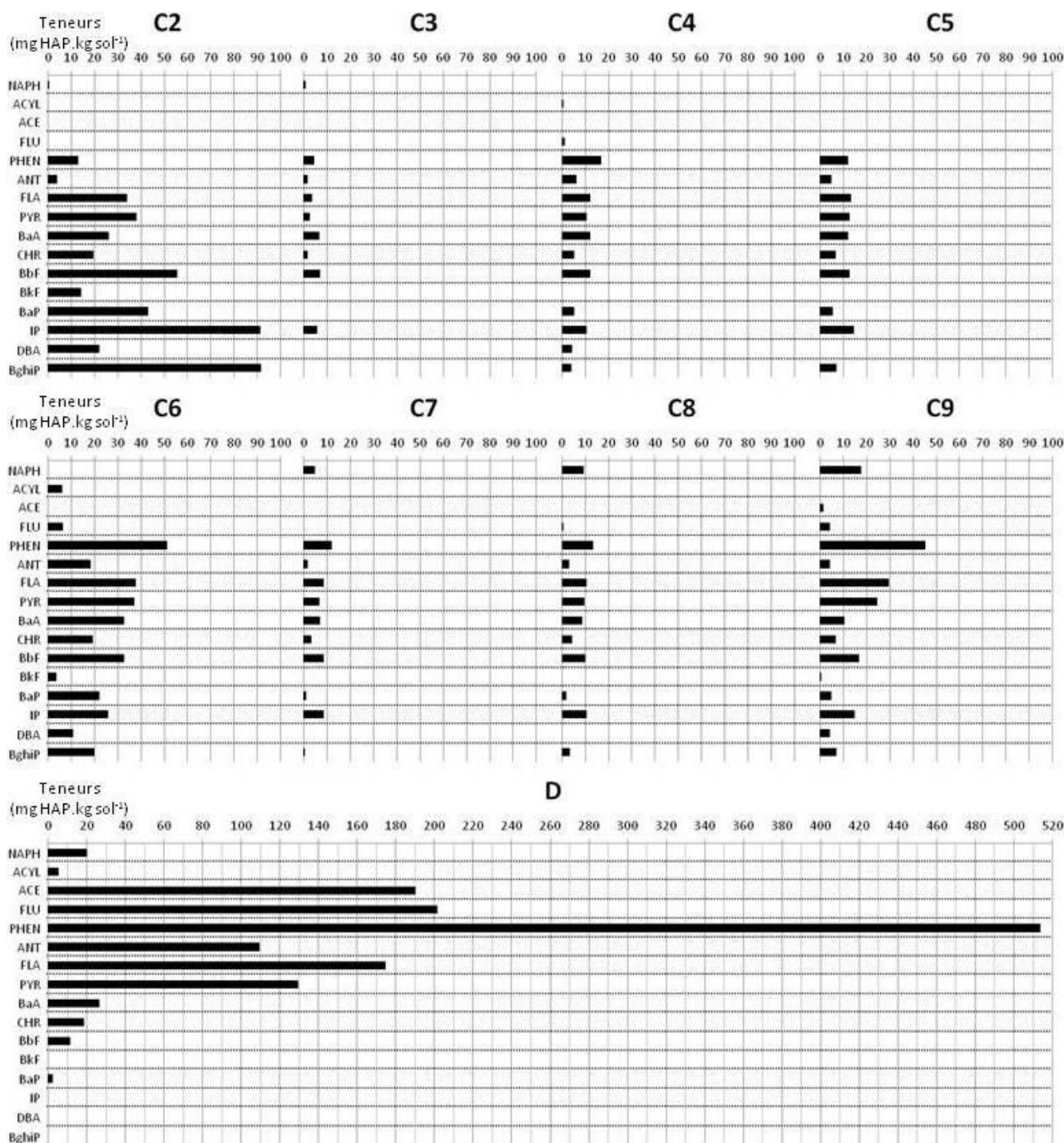


Figure I 10: Profils de contamination par les 16 HAP de la liste US EPA dans les échantillons de sol des sites A, B, C et D (échelle différente pour le profil de l'échantillon du site D)

Les résultats présentés par la figure I 10 confirment la faible contamination par les 16 HAP de la liste US EPA des échantillons provenant de l'ancien dépôt de bus (site A). Ainsi seuls les échantillons suivants sont conservés pour la suite des caractérisations abiotiques : A1 en tant qu'échantillon faiblement contaminé (teneurs par HAP inférieures à 1 mg.kg⁻¹), A3 et A12 en tant que contaminations plus importantes dominées par les HAP lourds (teneurs individuelles autour de 10 mg.kg⁻¹ pour les HAP de 5 et 6 cycles). Ces trois échantillons sont également choisis car provenant des profondeurs les plus superficielles (tableau I 2). Les

échantillons prélevés à moins de 2 m sont en effet privilégiés, car il a déjà été montré que la diversité fongique des sols diminue avec la profondeur (Warcup, 1951 et 1957 ; Ekelund *et al.*, 2001). Les deux échantillons provenant du site de Dunkerque (site B) présentent deux niveaux de contamination différents en HAP, mais avec un même profil dominé par les masses molaires moyennes (du PHEN au CHR). Les échantillons de l'ancienne usine à gaz (site C) présentent une diversité de taux et de profil de contamination. En effet les échantillons C1 et C3 ne possèdent que de faibles teneurs par HAP (autour de 5 mg.kg⁻¹) pour les masses molaires moyennes (du PHEN au CHR) et le BbF. Les teneurs sont légèrement supérieures chez les échantillons C4, C5, C7 et C8 (≈ 10 mg.kg⁻¹ par HAP) et comprennent des HAP lourds. Les échantillons C2, C6 et C9 présentent les plus fortes teneurs du site. C6 et C9 ont un profil dominé par le phénanthrène (≈ 50 mg.kg⁻¹), tandis que ce sont les HAP lourds qui prédominent dans le sol C2 (317 mg.kg⁻¹ de 5 et 6 cycles). L'unique échantillon de Chambly (site D) possède des teneurs bien supérieures à tous les autres échantillons et un profil dominé par le phénanthrène (514 mg.kg⁻¹) cohérent avec la contamination à la créosote.

2.2. Propriétés pédologiques et hydriques des échantillons

Sur un total de 25 échantillons, 15 sont utilisés pour des analyses pédologiques. Seuls trois échantillons du site A ont en effet été sélectionnés d'après leur contamination. La figure I 11 présente les résultats obtenus concernant la texture des sols étudiés.

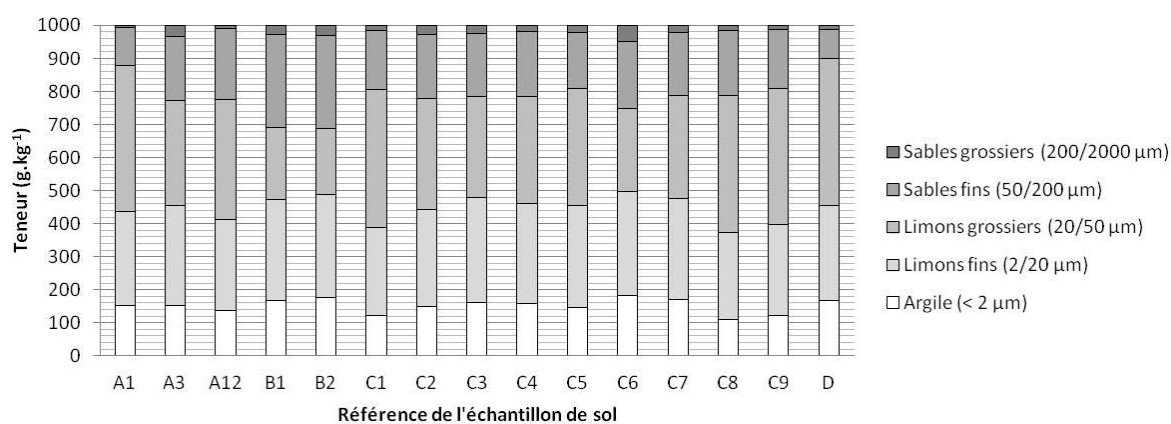


Figure I 11: Texture des échantillons de sol industriel

Les résultats présentés par la figure I 11 montrent une prédominance des limons fins et grossiers dans les textures des échantillons des sites A, C et D cohérent avec le fond géologique des régions de Roubaix et Chambly. Le site A présente en effet des teneurs en limons totaux de 620 à 726 g.kg⁻¹, le site C de 566 à 687 g.kg⁻¹ et le site D de 734 g.kg⁻¹. Ces

résultats sont en adéquation avec les données fournies par l'outil cartographique de la BDAT (INRA, 2013) qui indique que ces régions présentent des teneurs en limons totaux de 450 à 1000 g.kg⁻¹. Les échantillons du site B présentent des proportions plus importantes de sables fins et de plus faibles teneurs en limons grossiers en accord avec les affleurements trouvés dans la zone de Dunkerque. Les teneurs en argile des échantillons étudiés vont de plutôt faibles (10-15%) à moyennes (15-25%) selon le classement défini par Pousset (2002), ce qui concorde également aux données de la BDAT pour ces régions (100 à 250 g.kg⁻¹). La texture des sols joue un rôle important sur la biodisponibilité des hydrocarbures (Sijm *et al.*, 2000 ; Chung et Alexander, 2002) et leur biodégradation (Jung *et al.*, 2008). Notamment, les argiles sont décrites pour lier les molécules hydrophobes et les rendre moins biodisponibles (Parrish *et al.*, 2005). Il a cependant également été montré que les sols sableux peuvent fortement adsorber les hydrocarbures du fait d'une microporosité importante (Löser *et al.*, 1999).

La texture des sols influence également leur capacité de rétention hydrique du fait de la variation de taille des pores et des forces de capillarité qui en résultent. L'humidité des sols est décrite pour influencer la persistance des HAP de par ses conséquences sur la séquestration de ces molécules et leur dégradation abiotique et biotique (Wick *et al.*, 2011). Le potentiel hydrique est le reflet des quantités d'eau disponibles aux microorganismes puisque pour absorber l'eau, un organisme doit être capable de surmonter les forces de rétention hydrique de la matrice du sol (Griffin, 1969). Ainsi la figure I 12 présente les teneurs hydriques des différents échantillons de sol après équilibrage à un même potentiel hydrique de -150 hPa. Cette valeur de potentiel hydrique est utilisée comme condition standard par le laboratoire "Interactions entre xénobiotiques organiques et systèmes sol-plante" (Institut d'Ecologie des Sols, Helmholtz Zentrum, Munich, Allemagne) pour la mesure de la dégradation de xénobiotiques organiques dans les sols. En effet, ce potentiel hydrique a été montré optimal pour la dégradation de trois pesticides (isoproturon, benazoline-éthyl et glyphosate) dans un panel de 10 sols agricoles aux propriétés physico-chimiques très différentes lors d'une étude précédente (Schroll *et al.*, 2006). D'après cette étude, la valeur de -150 hPa apparaît fournir les quantités d'eau optimales pour la dégradation de molécules organiques tout en préservant des conditions aérobies. Les teneurs hydriques déterminées à ce potentiel seront ainsi désignées en tant que "teneurs hydriques optimales" dans la suite de ce mémoire.

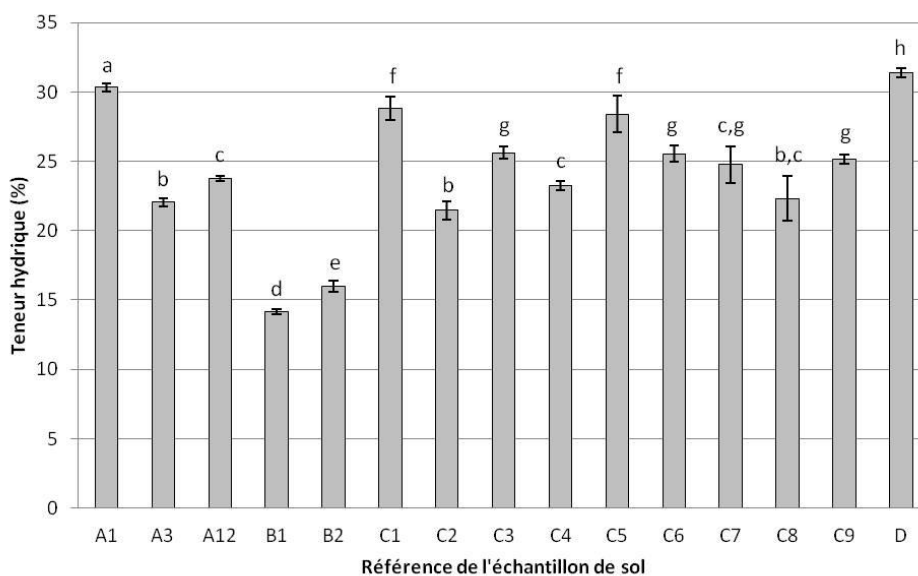


Figure I 12: Teneurs hydriques moyennes des échantillons de sols équilibrés à un potentiel hydrique de -150 hPa

Les teneurs hydriques moyennes pour un même potentiel hydrique présentées par la figure I 12 peuvent être mises en relation avec les teneurs en limons des échantillons. En effet, un échantillon présentant une granulométrie fine à prédominance limoneuse présentera des pores de taille plus réduite et des forces de capillarité supérieures à un sol sableux de granulométrie plus grande. En outre le transport par voie éolienne subi par les limons des plateaux impliqués dans la formation des sols considérés (mis à part le site B), entraîne une forme anguleuse des particules (Leplat, 1965) d'où une tortuosité des micropores et une augmentation des forces de capillarité. Les mesures vérifient ces principes, puisque les échantillons D et A1 possédant les teneurs en limons les plus élevées (734 et 726 g.kg⁻¹ respectivement) présentent les deux teneurs hydriques les plus importantes au potentiel hydrique utilisé. De même, les échantillons du site B qui présentent les teneurs les plus élevées en sables (≈ 300 g.kg⁻¹) et les plus faibles en limons (≈ 520 g.kg⁻¹) possèdent les teneurs hydriques les plus faibles à -150 hPa. Les autres échantillons proviennent de la même zone géographique (site de l'Union) et présentent des teneurs en limons semblables (≈ 600 g.kg⁻¹). Les variations de teneurs hydriques entre ces échantillons de textures proches sont à mettre en relation avec l'influence d'autres facteurs tels que les teneurs en matières organiques présentées par la figure I 13. L'importance des teneurs en matières organiques est en effet connue pour influencer positivement sur les capacités de rétention hydrique d'un sol (Bot et Benites, 2005). L'étude du rôle des matières organiques dans la séquestration des

hydrocarbures en sol est également importante, car ce phénomène semble prédominer sur l'interaction de ces molécules avec les surfaces minérales (Chikere *et al.*, 2011).

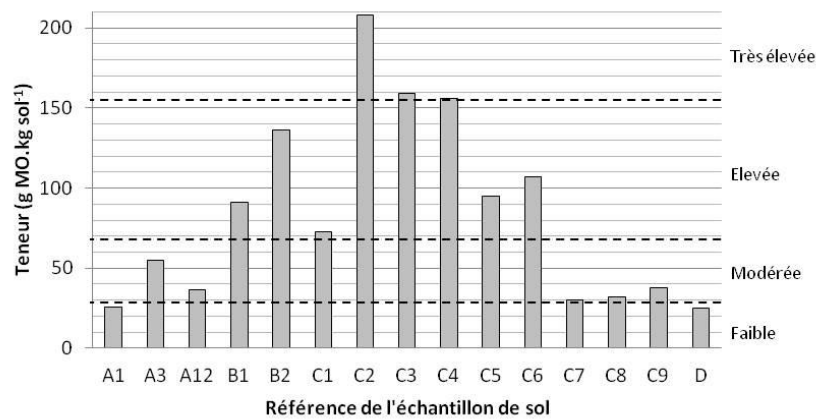


Figure I 13: Teneurs en matières organiques des échantillons de sol et classification selon le référentiel utilisé par Martin et Nolin (1991)

La figure I 13 montre que les teneurs en matières organiques sont assez variables entre les échantillons de sol. Les échantillons du site A présentent des teneurs faibles à modérées (de 27 à 45 g.kg⁻¹). Les échantillons du site B présentent des teneurs en matières organiques plus élevées (91 et 136 g.kg⁻¹ pour B1 et B2 respectivement). Au niveau du site C, les échantillons prélevés en surface du site (C1-C6) contiennent des teneurs en matières organiques supérieures à ceux de l'intérieur des gazomètres (C7-C9). L'échantillon du site D présente une teneur faible de 25 g.kg⁻¹. La contamination des sols en HAP est dépendante du polluant en termes de quantité et de nature, mais aussi de la capacité du sol à séquestrer les molécules de HAP. Le rôle des matières organiques est décrit comme important dans la rétention des hydrocarbures (Chikere *et al.*, 2011). En accord avec ce principe, la plus grande teneur en matières organiques est retrouvée dans l'échantillon présentant la contamination la plus forte en HAP dans le cas du site B (échantillon B2). La même remarque peut être faite pour le site C (échantillon C2). Les échantillons provenant de l'intérieur des gazomètres du site C (échantillon C7 à C9) présentent même une très bonne corrélation entre teneurs en matières organiques et en HAP. Cependant ce phénomène n'est pas généralisable à tous les échantillons dans le cadre de notre étude certainement du fait de la variabilité des contaminations y compris sur un même site. Cette difficulté d'interprétation peut également être liée à l'interdépendance complexe qui existe entre contamination en hydrocarbures et teneurs en matières organiques dans les sols. La teneur en matières organiques influence en effet la séquestration des hydrocarbures et la biodégradation des hydrocarbures joue sur les teneurs en matières organiques.

Le développement des microorganismes dans les sols est influencé par les ressources en nutriments et particulièrement par les sources de carbone et d'azote qui représentent les principaux constituants des molécules organiques. C'est pourquoi ces paramètres ont été analysés dans les échantillons étudiés (figure I 14).

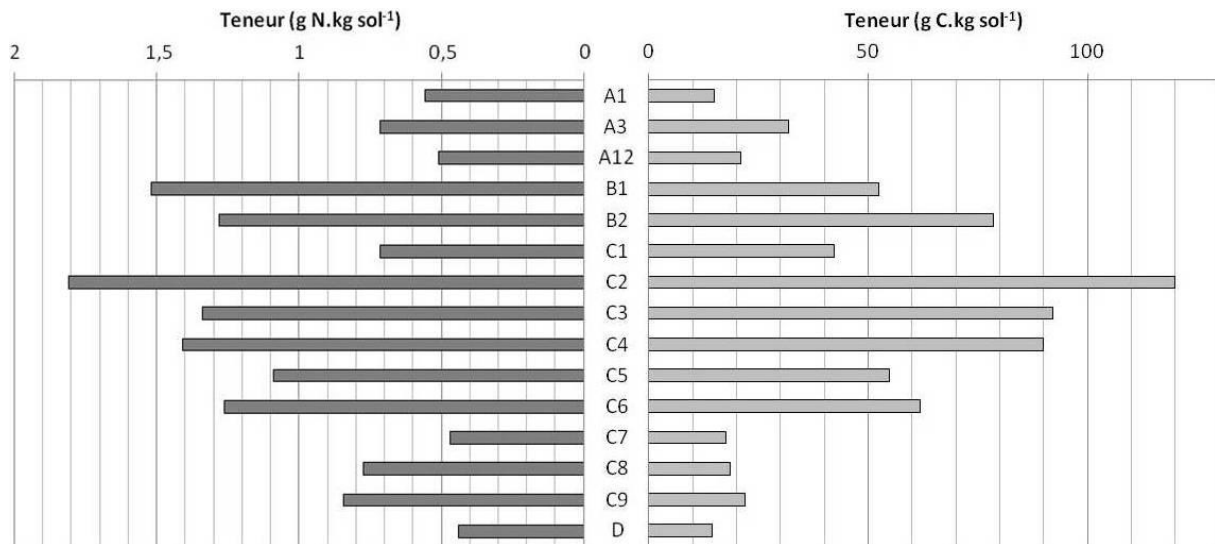


Figure I 14: Teneurs en carbone et azote des échantillons de sol

La figure I 14 montre que tous les échantillons présentent des teneurs très faibles en azote (de 0,5 à 1,8 g.kg⁻¹). Une autre étude (Singh *et al.*, 1995) menée au cours du temps sur des sols contaminés par une centrale à charbon à différentes distances du point d'émission a souligné un abaissement des teneurs en azote total corrélé à une diminution des taux de minéralisation avec la contamination. Les teneurs en carbone sont beaucoup plus importantes (de 14 à 120 g.kg⁻¹) que celles en azote, mais avec des variations similaires entre les échantillons pour les 2 paramètres. Les variations des teneurs en carbone sont aussi directement corrélées à celles des teneurs en matières organiques, car la teneur en matières organiques est calculée par multiplication de la teneur en carbone organique par le facteur de van Bemmelen (1890). Ce facteur (1,724) repose sur l'hypothèse que le contenu en carbone des matières organiques est de 58% en moyenne. La teneur en carbone organique est une valeur importante pour l'étude des contaminations par les hydrocarbures. En effet une étude a montré que ce facteur physico-chimique serait le seul influant significativement la capacité de sorption des composés organiques hydrophobes dont les HAP dans les sols (Site, 2001).

Le ratio "teneur en carbone organique/teneur en azote total" (C/N) est une valeur indicatrice du degré d'évolution des matières organiques. La figure I 15 présente les ratios C/N des échantillons étudiés.

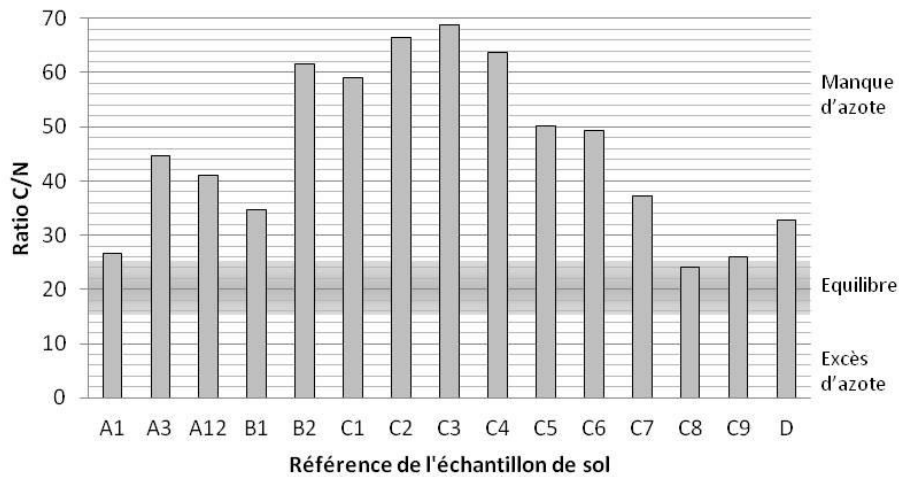


Figure I 15: Ratios C/N des échantillons de sol et les conséquences théoriques sur la décomposition des matières organiques selon le référentiel de Duchaufour (1988, à droite)

La figure I 15 représente les ratios C/N mesurés et les conséquences théoriques sur la décomposition des matières organiques dans les sols d'après Duchaufour (1988). Selon ce référentiel, un ratio C/N inférieur à 10 conduit en théorie à une minéralisation favorisée et à la production d'azote minéral. Dans la zone autour d'un rapport moyen de 20, la minéralisation et l'humification s'équilibrent. Au-delà d'un ratio de 50, la quantité d'azote nécessaire à la décomposition des molécules carbonées n'est pas fournie et les processus de minéralisation et d'humification sont très lents (Duchaufour, 1988). Mis à part l'échantillon faiblement contaminé du site A (A1) et des échantillons de l'intérieur du gazomètre du site C (C8 et C9) qui se situent dans la zone d'équilibre théorique carbone/azote, l'ensemble des échantillons présente des ratios C/N indicateurs d'un déficit en azote. La teneur en azote de ces sols ne permet donc pas la dégradation des molécules carbonées et constitue une raison supplémentaire de la persistance des HAP. Il est cependant à souligner que les valeurs C/N théoriques concernent les quantités d'azote et de carbone biodisponibles et que la nature et la dégradabilité des molécules constituant la source de carbone vont également jouer un rôle dans cet équilibre. De cette façon les contaminations des échantillons en hydrocarbures complexes peuvent augmenter artificiellement les ratios C/N. De même une partie plus ou moins importante de l'azote total peut être fixée sous forme d'ammonium (NH_4^+) sur les argiles et constituer ainsi une fraction non biodisponible (Stevenson, 1994). L'interprétation de ce ratio est donc difficile en pratique.

La figure I 16 présente le pH des échantillons de sol et leur classification selon le référentiel pédologique (AFES, 1995).

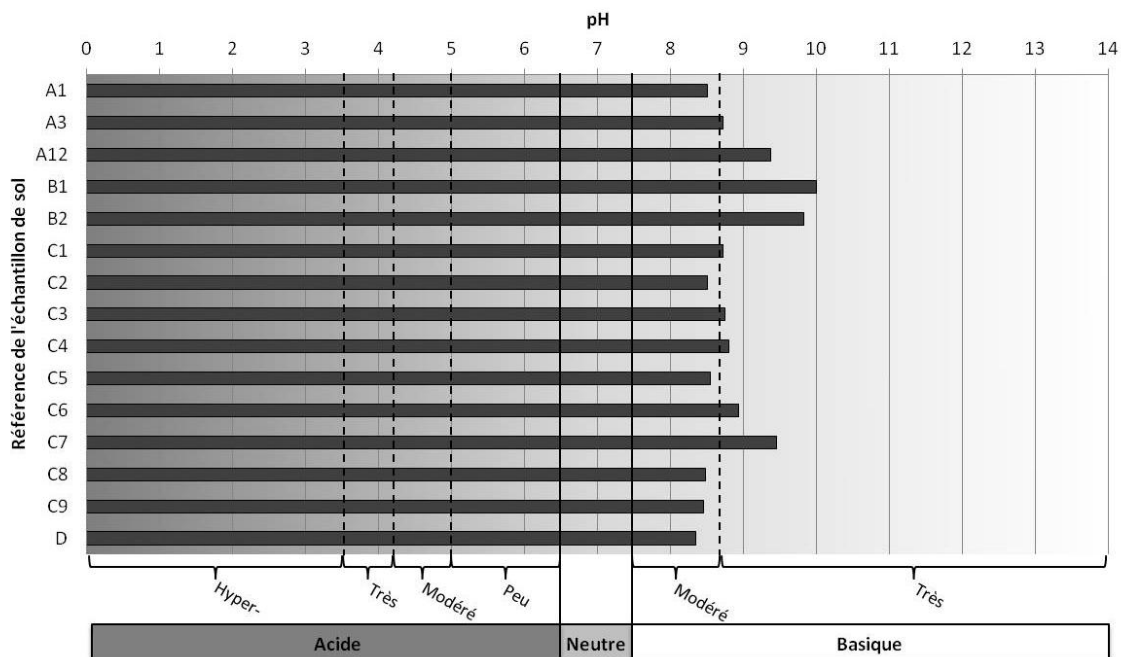


Figure I 16: pH des échantillons de sol et classification selon le référentiel pédologique (AFES, 1995)

La figure I 16 permet d'observer que les pH des échantillons de sol étudiés sont basiques à très basiques. La présence de carbonates de sodium dans les sols peut être d'origine naturelle du fait de la nature des matériaux parents ou d'origine anthropique (Levy et Shainberg, 2005). La grande basicité des échantillons B1 et B2 pourrait ainsi s'expliquer par leur origine sédimentaire (assise de Dunkerque), ce qui est cohérent à la description des sols de cette zone en tant que sols calcaires. L'outil cartographique de la BDAT indique en effet des sols de pH supérieurs à 8 dans cette zone. Les échantillons provenant de Roubaix et Chambly sont décrits comme des sols limoneux sur substrats crayeux par les données géologiques et la BDAT présente des pH de 7 à 8 pour ces régions. Ces limons des plateaux d'origine éolienne lössique commune (Antoine, 2002) sont décrits comme partiellement calcaires dans les notices des feuilles de Lille-Halluin et de Creil, ce qui peut expliquer ces pH. Mais l'influence des activités humaines a également pu avoir un impact sur la basicité mesurée chez l'ensemble des échantillons de sols étudiés. En effet les processus industriels utilisant du charbon ou du lignite peuvent être responsables de l'augmentation de pH des sols par la production de cendres contenant de l'oxyde de calcium et des sels de sodium, ce qui a déjà été montré sur des sites industriels (Singh *et al.*, 1995). Un pH élevé est décrit pour diminuer la solubilité de nombreux nutriments dans les sols (Lucas and Davis, 1961), ce qui peut notamment affecter la dégradation des contaminants. La biodégradation des hydrocarbures en sol est en effet considérée optimale entre des pH de 6 à 8 dans des pratiques de Landfarming (US EPA, 2006).

Une mesure importante pour l'évaluation de la disponibilité des nutriments dans les sols est la capacité d'échange cationique (CEC). La figure I 17 présente les résultats concernant les échantillons étudiés. La méthode consiste en la mesure spectrométrique des quantités de cobalthexamine (gros cation organo-métallique) adsorbées par les sols en solution. L'avantage est que cette mesure est effectuée au pH réel du sol. Le résultat est en conséquence désigné comme CEC "effective".

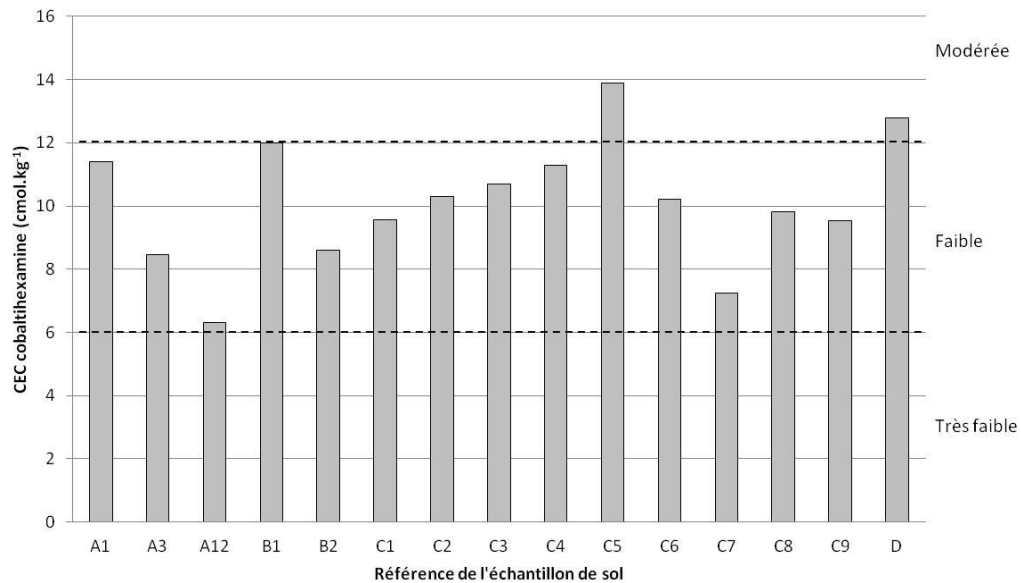


Figure I 17: Capacités d'échange cationique effectives des échantillons de sol et classification utilisée par Martin et Nolin (1991, à droite)

Les CEC effectives mesurées dans les échantillons sont faibles à modérées de façon cohérente à ce qu'indique la BDAT (CEC de 8 à 12), ce qui est surprenant du fait des pH élevés des sols étudiés. Un sol de pH élevé présente en effet moins d'ion H⁺ en solution susceptibles d'entrer en compétition avec les cations pour se lier à la matrice. D'autres facteurs influant la CEC sont les teneurs en matières organiques et argiles qui sont les principaux sites de fixation des cations. Il n'y a cependant pas de corrélation claire entre les CEC effectives obtenues et les teneurs en matières organiques et argiles des échantillons. Une explication pourrait être la contamination des sols aux hydrocarbures qui est décrite diminuer les capacités d'échanges ioniques mesurées (Hübner, 2002). De fait, les HAP se fixant très fortement aux argiles et à la matière organique (Richnow *et al.*, 1995), ils sont susceptibles de diminuer la fixation des ions de par leur caractère hydrophobe. Cependant d'autres études ont montré que les suies peuvent augmenter la CEC des sols (Liang, 2006).

3. Isolement de souches fongiques

Sept des quinze échantillons de sol caractérisés du point de vue pédologique et de leur contamination en HAP sont sélectionnés pour l'isolement de souches fongiques. Cette sélection se fait sur des critères de diversité de texture, d'origine géographique, de teneur en HAP totaux et de profil de contamination. Le sol A1 représente un échantillon faiblement contaminé et A12 celui le plus contaminé du site A. L'échantillon B2 est l'échantillon présentant la plus forte contamination en HAP du site B. Concernant le site C, l'échantillon C2 présente un profil de contamination particulier dominé par les HAP de hautes masses molaires, C6 présente un profil représentatif des échantillons de la surface du site avec les plus fortes teneurs et C9 est l'échantillon de l'intérieur des gazomètres le plus contaminé. Le sol D est également conservé en tant que seul échantillon du site de Chambly et pour sa contamination extrêmement élevée en HAP de faibles masses molaires. L'objectif premier de ces expérimentations étant la constitution d'une mycothèque et non une description exhaustive de la diversité microbienne, des méthodes par mise en culture sont utilisées.

3.1. Souches métaboliquement actives dans le sol

Une première technique d'isolement est utilisée afin de cibler spécifiquement les souches fongiques présentes à un état métabolique actif dans les sols. Ces souches sont particulièrement intéressantes, car elles possèdent l'aptitude de se développer en présence de contaminants et sont donc susceptibles de résister à leur toxicité voire de les dégrader. Cette méthode consiste à repérer les hyphes se développant après 24h à partir de particules de sol déposées sur milieu gélosé puis de les transférer sur un milieu neuf après 48h d'incubation. Waksman (1916) a en effet déterminé que le temps de 24 h n'est pas suffisant pour atteindre un tel développement mycélien à partir de spores. Cependant, l'ensemble des hyphes repérés après 24h ne reste pas viable après la phase de repiquage sur milieu neuf. Ces pertes peuvent être liées à une mauvaise excision des hyphes lors du transfert vers les milieux neufs ou à un manque d'adaptation de la souche à la composition du milieu MEA. Afin d'avoir une meilleure représentation du nombre de souches métaboliquement actives, la figure I 18 représente à la fois le nombre de particules de sol présentant des filaments après 24h d'incubation et le nombre de souches fongiques isolées par le biais de cette méthode dans les échantillons de sol étudiés.

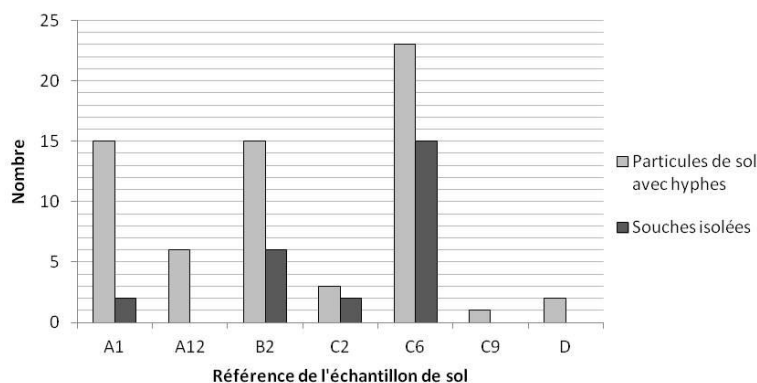


Figure I 18: Nombres de particules de sol présentant des hyphes après 24h et de souches métaboliquement actives isolées via la technique d'inoculation directe (Waksman, 1916) par échantillon de sol

La technique d'inoculation directe développée par Waksman (1916) a permis l'isolement de 25 souches dans le cadre de cette étude. Ces souches fongiques proviennent des échantillons A1, B2, C2 et C6. La faible présence de micromycètes métaboliquement actifs n'a pas permis d'isolement dans les autres échantillons. Une hypothèse est que le faible nombre de souches métaboliquement actives soit en partie corrélé avec la difficulté d'accès à l'oxygène. Le sol A12 a en effet été prélevé par forage au travers d'une dalle de béton, le sol C9 provenait de l'intérieur d'un gazomètre et le sol D est particulièrement saturé en eau. Au contraire, l'échantillon A1 a été prélevé au niveau de la végétation de la cour d'un bâtiment, l'échantillon B2 en surface et les échantillons C2 et C6 à partir de terres excavées. En outre les contaminations en hydrocarbures ou par d'autres contaminants peuvent également jouer un rôle. La créosote est une huile aux propriétés antifongiques utilisées par le passé pour la protection du bois et la forte contamination de l'échantillon D par cette substance peut notamment expliquer l'absence d'isolement de souches fongiques. Cependant les résultats de la figure I 18 se limitent aux souches fongiques cultivables dans les conditions expérimentales choisies et des études de séquençage à haut débit sont donc nécessaires pour étayer cette hypothèse.

3.2. Populations fongiques totales

La méthode de suspension/dilution est utilisée afin de réaliser un comptage des populations fongiques cultivables totales, c'est-à-dire aussi bien présentes sous forme active que sous la forme de propagules quiescentes. Comme toutes les méthodes passant par la culture de microorganismes, cette technique présente en effet le biais de sélectionner les souches les mieux adaptées aux conditions expérimentales choisies. Cependant l'objectif principal de cette étude est de constituer une mycothèque de souches issues de sols

contaminés afin d'étudier leur potentiel en bioremédiation et non d'effectuer un inventaire exhaustif. La figure I 19 présente les résultats de ces comptages après 6 jours d'incubation.

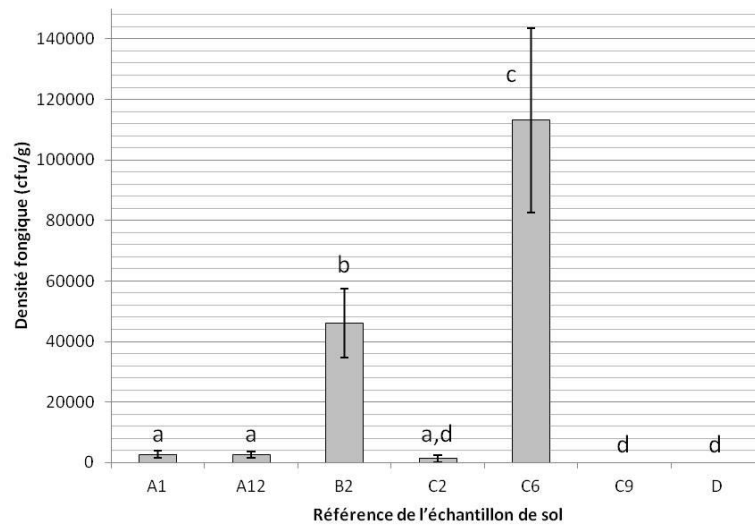


Figure I 19: Densités de population fongique moyennes des échantillons de sol mesurées par la méthode de suspension/dilution après 6 jours d'incubation (cfu = colony-forming unit)

Les densités fongiques obtenues sont globalement cohérentes avec les isolations de souches métaboliquement actives. L'échantillon de sol présentant la plus grande densité de population fongique est en effet le sol C6 ($1,13 \cdot 10^5$ cfu/g) suivi du sol B2 ($4,6 \cdot 10^4$ cfu/g), et les échantillons A1 et C2 présentent des densités qui ne diffèrent pas statistiquement. Les échantillons C9 et D ne présentent aucun développement fongique après 6 jours. Il est ainsi fortement probable que les contaminations liées aux activités humaines aient radicalement affecté la flore fongique de ces échantillons. L'échantillon A12 présente un faible niveau de densité fongique du même ordre que celui des échantillons A1 et C2. L'absence d'isolement de souches métaboliquement actives à partir de cet échantillon s'explique par un biais lié à la méthode utilisée. Le succès de reprise de la croissance des hyphes après transplantation sur milieu MEA n'est en effet pas systématique.

La méthode de suspension/dilution est également utilisée pour l'isolement de souches fongiques par le prélèvement de colonies sur les milieux servant aux comptages et par leur purification par repiquages successifs sur des milieux neufs. Un total de 21 souches vient ainsi enrichir la collection d'isolats fongiques établie dans le cadre de cette étude. Les sols C9 et D n'ont permis aucun isolement par l'une des deux techniques employées. Cependant des colonies se développant à partir de particules de sol au-delà du délai de 24h imposé par le protocole de Waksman (1916) ont permis l'isolement de trois souches du sol C9 et de deux

souches du sol D. Ces souches ne peuvent cependant être considérées comme métaboliquement actives dans ces sols.

3.3. Caractérisation de la mycothèque

Sur les 51 isolats obtenus par les deux techniques d'isolement, 30 souches sont sélectionnées selon la diversité morphologique de leurs colonies sur milieu MEA du point de vue macroscopique. Ces 30 souches constituent la mycothèque de cette étude. La figure I 20 permet d'observer l'apparence macroscopique des cultures sur milieu MEA des souches de la mycothèque après 2 semaines d'incubation.



Figure I 20: Photographie de l'apparence des cultures des 30 isolats après 2 semaines d'incubation sur MEA

La figure I 20 permet de voir la diversité morphologique très importante des cultures des souches obtenues par isolement à partir des différents échantillons de sol contaminé. Au

total, 6 souches proviennent du sol A1 (souches 1 à 6), 2 du sol A12 (7 et 8), 5 du sol B2 (9 à 13), 4 du sol C2 (14 à 17), 10 du sol C6 (18 à 27), 1 du sol C9 (28) et 2 du sol D (29 et 30).

Le tableau I 3 résume les caractéristiques morphologiques des colonies sur milieu MEA d'un point de vue macroscopique et les identifications génétiques concernant les souches étudiées pour leurs capacités de biodégradation des HAP (chapitre II, page volante).

Tableau I 3: Description macroscopique et identification génétique des isolats fongiques

Numéro d'isolat	Sol d'origine	Méthode d'isolement	Type de thalle	Aspect de la culture	Forme de la culture	Couleur face supérieure	Couleur face inférieure	Vitesse de croissance	Identification génétique
1	A1	Inoculation directe	Ras plissé	Poudreux	Régulier	Blanchâtre	Blanchâtre	Rapide	X
2	A1	Inoculation directe	Ras	Poudreux	Régulier	Vert foncé, concentrique	Bleu-violet, concentrique	Rapide	X
3	A1	Suspension/Dilution	Aérien	Cotonneux	Régulier	Blanc	Blanchâtre	Rapide	X
4	A1	Suspension/Dilution	Ras	Cotonneux	Vagues	Rose clair + gouttes rouges	Orange foncé	Lent	<i>Penicillium canescens</i> Sopp
5	A1	Suspension/Dilution	Ras plissé	Poudreux	Régulier	Brun	Bleuâtre	Rapide	<i>Cladosporium cladosporioides</i> aggr.
6	A1	Suspension/Dilution	Ras plissé	Poudreux	Régulier	Orange, concentrique	Jaune	Lent	X
7	A12	Suspension/Dilution	Ras	Poudreux	Vagues	Gris-or, concentrique	Brun-bleu, concentrique	Rapide	<i>Penicillium roqueforti</i> Thom
8	A12	Suspension/Dilution	Aérien	Cotonneux	Régulier	Blanc	Blanc	Lent	X
9	B2	Inoculation directe	Ras plissé	Poudreux	Régulier	Blanc-beige, concentrique	Jaunâtre	Rapide	X
10	B2	Inoculation directe	Aérien	Cotonneux	Régulier	Gris-blanc	Orangé	Très rapide	X
11	B2	Inoculation directe	Ras plissé	Poudreux	Rayons	Blanc	Blanchâtre, concentrique	Rapide	X
12	B2	Inoculation directe	Aérien	Cotonneux	Régulier	Blanc	Orangé	Très rapide	<i>Fusarium solani</i> Martius
13	B2	Inoculation directe	Ras plissé	Poudreux	Régulier	Brun, concentrique	Brun-bleu, concentrique	Rapide	X
14	C2	Inoculation directe	Ras	Poudreux	Rayons	Gris foncé	Gris foncé	Lent	X
15	C2	Inoculation directe	Ras plissé	Poudreux	Régulier	Brun, liseré jaune	Brun, liseré jaune	Lent	X
16	C2	Suspension/Dilution	Aérien	Cotonneux	Régulier	Gris-beige, concentrique	Beige, concentrique	Rapide	X
17	C2	Suspension/Dilution	Aérien	Cotonneux	Spirale	Blanc + gouttes oranges	Orangé	Rapide	X
18	C6	Inoculation directe	Ras	Poudreux	Régulier	Jaune	Jaune	Lent	<i>Talaromyces helicus</i> Raper & Fennell
19	C6	Inoculation directe	Ras	Cotonneux	Rayons	Blanc-bleu	Blanc-gris, concentrique	Très rapide	<i>Fusarium oxysporum</i> aggr.
20	C6	Inoculation directe	Ras	Cotonneux	Régulier	Brun-vert	Bleu foncé	Très rapide	<i>Humicola</i> sp.
21	C6	Inoculation directe	Ras	Cotonneux	Vagues	Blanchâtre	Blanchâtre	Très rapide	<i>Bionectria ochroleuca</i> Schweinitz
22	C6	Inoculation directe	Ras plissé	Cotonneux	Vagues	Vert	Vert	Rapide	<i>Cladosporium bruhnei</i> Linder
23	C6	Inoculation directe	Ras	Cotonneux	Vagues	Blanc rosé	Blanchâtre	Très rapide	X
24	C6	Inoculation directe	Ras	Cotonneux	Vagues	Blanc-verdâtre	Vert foncé	Rapide	<i>Cladosporium</i> sp.
25	C6	Inoculation directe	Ras plissé	Poudreux	Vagues	Blanc	Blanchâtre	Rapide	X
26	C6	Suspension/Dilution	Ras	Verruqueux	Régulier	Vert foncé	Verdâtre	Très rapide	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai
27	C6	Suspension/Dilution	Ras	Poudreux	Régulier	Jaune, vert, bleu, blanc, concentrique	Jaunâtre, concentrique	Lent	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom
28	C9	Particule de sol	Ras	Cotonneux	Régulier	Gris	Gris	Lent	X
29	D	Particule de sol	Ras	Cotonneux	Régulier	Blanc	Beige	Rapide	<i>Pseudallescheria</i> sp.
30	D	Particule de sol	Ras	Cotonneux	Vagues	Blanchâtre	Blanc	Très rapide	<i>Mortierella alpina</i> Peyronel

Le tableau I 3 confirme la diversité morphologique obtenue au sein de la mycothèque. Les identifications génétiques de certaines souches permettent en outre de noter que la quasi-totalité des souches identifiées appartient aux embranchements des Ascomycètes et des Deutéromycètes (anamorphes d'Ascomycètes). Seule la souche 30 appartient aux Zygomycètes. Ces proportions sont en parfaite adéquation avec les résultats d'une étude récente (Zafra *et al.*, 2014) où des isollements effectués à partir d'échantillon de sols contaminés au pétrole brut lourd ont permis l'isolement de 21 souches dont 20 appartiennent aux Ascomycètes et 1 aux Zygomycètes. Ces embranchements ont également été rencontrés dans des sols contaminés aux HAP par une usine à gaz lors d'une autre étude d'isollements où, sur 21 isolats, 19 appartenaient aux Deutéromycètes, 1 aux Zygomycètes et 1 aux Mastigomycètes (Potin *et al.*, 2004 a).

Parmi les souches identifiées (14), le genre le plus retrouvé dans les conditions de culture de notre étude est le genre *Penicillium* avec 4 souches identifiées (*Talaromyces* est la forme sexuée de certains *Penicillium*), suivi par les genres *Cladosporium* (3 isolats) et *Fusarium* (2 isolats). Le genre *Penicillium* a déjà été rapporté prédominant lors de différents isollements à partir de sols impactés par des hydrocarbures (Oudot *et al.*, 1987 ; Saraswathy et Hallberg, 2002) et de sédiments contaminés aux HAP (Ravelet *et al.*, 2000) dont des sédiments marins (da Silva *et al.*, 2003 ; Salvo *et al.*, 2005). *Cladosporium* fait également parti des genres fréquemment isolés à partir de substrats contaminés par les HAP (Ravelet *et al.*, 2000 ; Atagana *et al.*, 2006 ; Salvo *et al.*, 2005 ; Potin *et al.*, 2004 a et b), de même que *Fusarium* (Oudot *et al.*, 1987 ; Rafin *et al.*, 2000 ; Potin *et al.*, 2004 a ; Atagana *et al.*, 2006). Au sein de notre mycothèque, il est à souligner que la majorité des espèces du genre *Penicillium* (trois sur quatre) ont été isolées par la méthode de suspension/dilution. Cela signifie que les espèces de ce genre n'étaient pas obligatoirement dans un état métaboliquement actif dans les échantillons de sol, contrairement aux genres *Fusarium* et *Cladosporium* dont deux espèces de chaque genre ont été isolées par la méthode d'inoculation directe (Waksman, 1916). Les fortes capacités de sporulation des espèces du genre *Penicillium* pourraient ainsi expliquer sa prédominance en termes d'effectif, souvent rapportée dans le cadre d'isollements. Les études citées précédemment (Oudot *et al.*, 1987 ; Ravelet *et al.*, 2000 ; Saraswathy et Hallberg, 2002 ; da Silva *et al.*, 2003 ; Salvo *et al.*, 2005) utilisent en effet des méthodes d'isolement apparentées à la technique de suspension/dilution qui est connue pour favoriser l'isolement de souches sporulantes (Chesters et Thornton, 1956 ; Johansson, 2001). La possibilité de la présence du genre *Penicillium* sous forme

principalement quiescente souligne que son isolement en plus grand nombre n'est pas un indicateur suffisant d'un rôle prédominant dans la dégradation des contaminants.

Il est ainsi intéressant de se focaliser également sur des espèces trouvées de manière moins fréquente dans notre étude telles que *Trichoderma harzianum* qui a déjà été isolée à partir de sols impactés par une ancienne usine à gaz (Sarawathy et Hallberg, 2002). Le genre *Mortierella* a également déjà été rapporté lors d'isolements à partir de sols d'antarctique contaminés au fuel (Hughes *et al.*, 2007).

L'analyse des résultats souligne les limites des techniques passant par la culture des microorganismes pour l'analyse des communautés microbiennes. Une étude plus précise de la composition des communautés fongiques nécessiterait ainsi l'utilisation de techniques d'empreinte génétique telles que la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ou la t-RFLP (terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) couplées à la qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) pour la quantification des espèces et au séquençage ADN pour leur identification. Cependant dans le cas de notre étude, le recours à des techniques passant par la mise en culture des souches était nécessaire afin d'effectuer des isolements dans l'objectif principal de constituer une mycothèque.

Le tableau I 4 présente la classification taxonomique des souches identifiées et précise la dénomination de leur forme de reproduction asexuée (anamorphe) et sexuée (téléomorphe) dans la mesure où cette dernière est connue.

Tableau I 4: Classification phylogénique des souches fongiques identifiées (source : Mycobank, 2013)

N° souche	Ordre	Famille	Anamorphe	Téléomorphe
4	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Penicillium canescens</i> (Deutéromycète)	Inconnu
5	Capnodiales	Davidiellaceae	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Deutéromycète)	Complexe d'espèces
7	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Penicillium roqueforti</i> (Deutéromycète)	Inconnu
12	Hypocréales	Nectriaceae	<i>Fusarium solani</i> (Deutéromycète)	<i>Haematonectria haematococca</i> (Ascomycète)
18	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Penicillium helicum</i> (Deutéromycète)	<i>Talaromyces helicus</i> (Ascomycète)
19	Hypocréales	Nectriaceae	<i>Fusarium oxysporum</i> (Deutéromycète)	Inconnu (Ascomycète)
20	Sordariales	Chaetomiaceae	<i>Humicola sp.</i> (Deutéromycète)	?
21	Hypocréales	Bionectriaceae	<i>Clonostachys rosea</i> (Deutéromycète)	<i>Bionectria ochroleuca</i> (Ascomycète)
22	Capnodiales	Davidiellaceae	<i>Cladosporium bruhnei</i> (Deutéromycète)	<i>Davidiella allicina</i> (Ascomycète)
24	Capnodiales	Davidiellaceae	<i>Cladosporium sp.</i> (Deutéromycète)	?
26	Hypocréales	Hypocreaceae	<i>Trichoderma harzianum</i> (Deutéromycète)	<i>Hypocrea lixii</i> (Ascomycète)
27	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Penicillium chrysogenum</i> (Deutéromycète)	Inconnu
29	Microascales	Microascaceae	<i>Scedosporium sp.</i> (Deutéromycète)	<i>Pseudallescheria sp.</i> (Ascomycète)
30	Mortierellales	Mortierellaceae	X	<i>Mortierella alpina</i> (Zygomycète)

Les identifications présentées par le tableau I 4 permettent d'obtenir des informations sur l'écologie des isolats concernés.

Les différentes espèces du genre *Penicillium* peuvent coloniser une grande variété d'environnements et sont ainsi trouvées communément dans les sols, les aliments, les boissons ou l'air des habitations (Leitão, 2009). *Penicillium canescens* est une espèce retrouvée mondialement au niveau des sols et plus rarement au niveau du bois, des matériaux d'isolation ou des aliments (riz, pois et fromage). *Penicillium roqueforti* est un champignon acido-résistant commun dans les régions tempérées. Connu pour son utilisation dans la production de fromages de type bleu, il est également retrouvé comme contaminant alimentaire au niveau de produits réfrigérés et isolé à partir de sols et d'ensilages. *Talaromyces helicus* est la forme sexuée de *Penicillium helicum* (Stolk et Samson, 1972), une espèce assez rare retrouvée principalement dans les sols et les substrats chauds et humides en décomposition. *Penicillium chrysogenum* est un micromycète fréquent dans l'environnement rendu célèbre pour son implication dans la découverte de la pénicilline. Il est retrouvé au niveau de sources très variées tels que les sols, l'air, le bois, les aliments, les murs, les matériaux d'isolement ou les textiles.

Fusarium est un genre large et variable qui comprend des champignons saprotrophes trouvés sur la matière végétale en décomposition ou parasites des plantes supérieures (Barnett et Hunter, 1998). *Fusarium solani* (téléomorphe *Haematonectria haematococca*) est un micromycète saprotrophe relativement fréquent et à large distribution, décrit également comme phytopathogène. *Fusarium oxysporum* est une espèce commune généralement saprotrophe présente dans les sols, sur des substrats végétaux ou sur des aliments, mais certaines variétés sont également décrites comme phytopathogènes.

Le genre *Cladosporium* comprend des espèces phylloplanes, parasites des plantes supérieures ou saprotrophes communes dans les échantillons d'air (Barnett et Hunter, 1998). La classification de ce genre est très imparfaite car elle repose historiquement sur des critères morphologiques et a ainsi dû être revue récemment (Bensch *et al.*, 2012). *Cladosporium cladosporioides* est un complexe d'espèces saprotrophes très communes et retrouvées au niveau du matériel végétal en décomposition des sols, du bois mort, de la phyllosphère, de l'air externe et de la nourriture animale ou humaine. *Cladosporium bruhnei* (téléomorphe *Davidiella allicina*) est une espèce saprotrophe rencontrée fréquemment sur substrat végétal, mais aussi en eau salée ou résiduelle et en tant que contaminant de l'air.

Humicola est un genre constitué de champignons saprotrophes (Barnett et Hunter, 1998) et retrouvé à l'échelle mondiale dans des écosystèmes très variés comme des sols, des sables, des végétaux, de l'eau de mer ou des effluents.

Bionectria ochroleuca (anamorphe *Clonostachys rosea*) est une espèce retrouvée communément sur les végétaux et dans les sols notamment au niveau des littoraux, polders, dunes ou estuaires. Elle est également décrite comme mycoparasite et étudiée comme biopesticide notamment contre *Botrytis cinerea* dans la culture des fraises (Viccini *et al.*, 2007).

Le genre *Trichoderma* comprend des espèces saprotrophes très communes trouvées dans les sols ou sur le bois, ainsi que certaines espèces parasites d'autres champignons (Barnett et Hunter, 1998). *Trichoderma harzianum* est la forme asexuée de *Hypocrea lixii*, un champignon de type pourriture molle qui dégrade les fibres de cellulose du bois et dont la distribution est très large. Il a ainsi été isolé à partir de sols, de débris végétaux en décomposition, de composte, de bois, de textiles ou sur des murs.

Pseudallescheria est un genre comprenant des champignons filamenteux eutrophiques couramment isolés en climat tempéré à partir de sols, de végétations, d'eaux polluées et d'excréments d'animaux. Ces champignons sont notamment décrits du fait de leur croissance favorisée par les pollutions et pour leur capacité à se développer en milieu anaérobie (de Hoog *et al.*, 1994), ce qui pourrait expliquer la présence de ce genre dans l'échantillon de sol C9. Certaines espèces sont étudiées du fait de leur émergence en tant que pathogènes opportunistes chez l'Homme (de Hoog *et al.*, 1994 ; Guarro *et al.*, 2006 ; Hugnet *et al.*, 2009).

Le genre *Mortierella* comprend des espèces saprotrophes communes dans les sols (Barnett et Hunter, 1998). *Mortierella alpina* est une mucorale mésophile retrouvée dans les régions tempérées principalement au niveau des sols.

L'ensemble des souches isolées et identifiées dans le cadre de cette étude correspond à des espèces saprotrophes adaptées à la vie dans un environnement tellurique. La présence de ces souches dans les échantillons de sols industriels utilisés est intéressante car elle reflète leur résistance aux contaminations qui y sont présentes. Lors d'une étude sur l'écologie des micromycètes telluriques, Warcup (1951) a isolé 148 espèces à partir de sols de pH différents parmi lesquels figurent *Humicola grisea*, *Mortierella alpina*, *Fusarium oxysporum* et *Penicillium canescens*. Il est intéressant de noter que, de façon cohérente avec notre étude, ces

espèces ont notamment été retrouvées dans des sols alcalins à très alcalins : *Humicola grisea* (pH 7,5 - 8), *Mortierella alpina* (pH 4,2 - 8), *Fusarium oxysporum* (pH 3,9 - 8) et *Penicillium canescens* (pH 3,9 - 7,5). La comparaison reste cependant limitée par les différences physico-chimiques (notamment une texture moins sableuse) et les contaminations des échantillons de notre étude.

Conclusion partielle

Dans un premier temps, le chapitre I décrit l'obtention et la caractérisation d'échantillons de sols présentant potentiellement une contamination historique en HAP. En effet par des expériences analytiques couplées à des recherches bibliographiques, le chapitre I nous permet de mettre en relation des données historiques et géologiques avec les analyses physico-chimiques des échantillons de sol étudiés. Ces analyses consistent en la mesure des profils de contamination par les 16 HAP de la liste US EPA dans les 25 échantillons de sol prélevés, puis en la caractérisation pédologique de 15 échantillons sélectionnés selon leur contamination. Ainsi, nous pouvons corréliser les propriétés pédologiques des échantillons de sol aux données géologiques disponibles sur les sites et leurs contaminations aux activités industrielles qui y ont eu cours.

Dans un second temps, la constitution d'une collection de souches fongiques provenant de sols historiquement contaminés aux HAP est décrite. L'isolement de 30 souches par deux techniques différentes est réalisé à partir de sept échantillons de sol sélectionnés selon la diversité de leur contamination, de leur origine et de leur texture. La caractérisation morphologique de la mycothèque obtenue met en évidence une grande diversité macroscopique des cultures. L'identification de certains isolats par analyse génétique nous donne accès à des données d'écologie microbienne les concernant. Il en ressort ainsi que les souches identifiées correspondent à des espèces saprotrophes telluriques appartenant aux embranchements des Ascomycètes et Deutéromycètes, ainsi qu'à celui des Zygomycètes concernant l'une d'entre elles.

Suite à cette étape descriptive de l'isolement des souches constitutives de la mycothèque à partir d'échantillons de sol historiquement contaminés, le chapitre II se focalise sur le potentiel de ces souches à dégrader les HAP.

Chapitre II : Relation entre le métabolisme fongique et la biodégradation des HAP: étude en milieu minéral et en microcosmes de sol au laboratoire

Sommaire

Sommaire	61
Introduction	63
Matériels et méthodes.....	65
1. Produits chimiques.....	65
1.1. Hydrocarbure Aromatique Polycyclique	65
1.2. Solvants	66
2. Etudes en milieu minéral.....	66
2.1. Milieux de culture.....	66
2.2. Inoculation des milieux de culture et conditions d'incubation	67
2.3. Etude de la désorption du BaP par les filtrats de culture.....	67
2.4. Etude de la capacité des souches à dégrader le BaP.....	68
2.5. Activités enzymatiques associées à la dégradation du BaP	69
2.5.1. Obtention des filtrats de cultures et production des lysats cellulaires.....	70
2.5.2. Mesure colorimétrique des activités enzymatiques	70
2.5.3. Quantification de l'activité de type manganèse-peroxydase.....	71
2.5.4. Dosage des activités lignine-peroxydase.....	72
2.5.5. Mesure des activités laccase	72
2.5.6. Dosage de l'activité époxydase du cytochrome P450.....	73
2.5.7. Quantification des activités catéchol 1,2- et 2,3-dioxygénases	74
2.5.8. Dosage de l'activité superoxyde dismutase	75
2.5.9. Mesure de l'activité glutathion peroxydase.....	76
2.5.10. Quantification de l'activité catalase	76

2.5.11.	Dosage de l'activité glucose-6-Phosphate déshydrogénase	77
3.	Expériences de dégradation des HAP en sols historiquement contaminés.....	77
3.1.	Choix des sols, des souches et préparation de l'inoculum.....	77
3.2.	Conditions d'incubation	78
3.4.	Extraction et dosage chromatographique.....	79
4.	Traitements statistiques.....	80
Résultats et Discussion.....		80
1.	Capacités de désorption et de dégradation du BaP par les isolats.....	80
1.1.	Etude de la désorption du BaP par les filtrats de culture.....	80
1.2.	Etude de la capacité des souches à dégrader le BaP.....	82
2.	Activités enzymatiques associées à la dégradation du BaP	84
2.1.	Enzymes directement impliquées dans la dégradation des HAP	85
2.1.1.	Corrélation entre capacités de dégradation du BaP et activités enzymatiques	85
2.1.2.	Activités enzymatiques manganèse-peroxydase	86
2.1.3.	Activités enzymatiques lignine-peroxydase	88
2.1.4.	Activités enzymatiques époxydase du cytochrome P450	89
2.2.	Enzymes de détoxification du stress oxydant	90
2.2.1.	Corrélation entre capacités de dégradation du BaP et activités enzymatiques	90
2.2.1.	Activités enzymatiques superoxyde dismutase	92
2.2.2.	Activités glucose-6-phosphate déshydrogénase et glutathion peroxydase.....	93
2.2.3.	Activités enzymatiques catalase.....	94
2.3.	Synthèse des résultats de mesures d'activités enzymatiques	96
3.	Expériences de dégradation des HAP en sols historiquement contaminés.....	99
3.1.	Choix des paramètres expérimentaux.....	99
3.2.	Expériences de bioaugmentation.....	101
3.3.	Couplage de la bioaugmentation et de la biostimulation d'une souche autochtone.....	105
Conclusion partielle		107

Introduction

La démarche scientifique décrite au sein de ce chapitre correspond aux premières étapes de développement d'un protocole de bioremédiation des HAP dans les sols par l'utilisation de souches fongiques saprotrophes. Cette démarche consiste en un criblage progressif de la collection de souches fongiques selon les capacités requises pour la bioremédiation des HAP dans les sols. En effet, les souches de la mycothèque constituée (chapitre I) sont d'abord caractérisées pour leurs capacités de désorption et de dégradation du Benzo[a]pyrène (BaP), un HAP de haute masse molaire. Cette molécule classifiée en tant que polluant prioritaire par l'US Environmental Protection Agency (US EPA) est choisie en tant que modèle d'étude pour son impact bien étudié sur l'environnement et la santé humaine et sa récalcitrance à la biodégradation. Les résultats de cette première étape de caractérisation sont ensuite utilisés pour l'étude des activités enzymatiques potentiellement impliquées dans la dégradation du BaP chez les souches efficaces. Enfin dans le but d'effectuer une première évaluation de la faisabilité de la technique à l'échelle du laboratoire, des expériences de dégradation sont réalisées en échantillons de sols historiquement contaminés en HAP par l'inoculation de souches fongiques préalablement sélectionnées et l'ajout de sources nutritives.

La figure II 1 présente la démarche expérimentale suivie au sein du chapitre II par rapport à la problématique scientifique étudiée. La page volante jointe au manuscrit permet de suivre les étapes de sélection correspondantes.

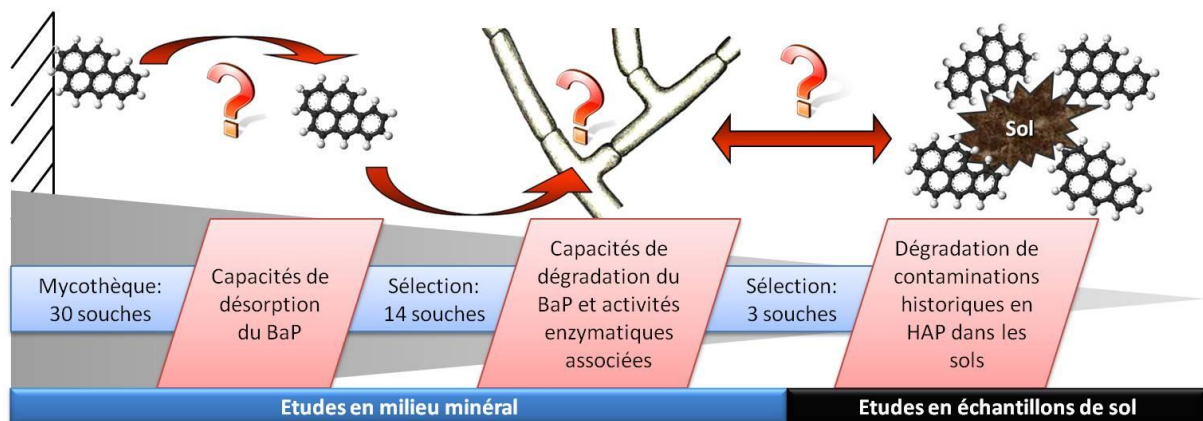


Figure II 1: Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale en fonction des questions scientifiques posées

Dans une première étape expérimentale menée en milieu minéral, les 30 souches de la mycothèque (tableau II 1) sont soumises à une sélection selon leurs capacités de désorption du BaP. La souche S19 (*Fusarium solani*) qui a été sélectionnée précédemment par le laboratoire

IPCR (UCEIV, ULCO, Dunkerque) comme modèle d'étude (§ 6.3 de l'introduction générale ; Rafin *et al.*, 2004) est également utilisée pour ces phases de caractérisations. Cette expérience consiste en la mesure par spectrofluorimétrie de la concentration en BaP solubilisée après 24 h à température ambiante par un filtrat d'une culture de 5 jours.

Lors d'une seconde étape, 14 souches sont sélectionnées selon trois critères : la capacité élevée de désorption du BaP, le développement de la biomasse dans les conditions de culture choisies et la diversité morphologique des colonies d'un point de vue macroscopique. Les capacités de dégradation du BaP de ces souches sont évaluées en milieu minéral par mesure en triplicata du BaP restant dans les cultures après 9 jours d'incubation. Ces quantités sont comparées à celles obtenues dans des témoins permettant d'évaluer les pertes en BaP liées aux phénomènes abiotiques et d'adsorption au mycélium pour chaque souche. Cette approche permet ainsi de calculer le pourcentage de dégradation biotique du BaP.

Les 14 souches sont également utilisées dans les mêmes conditions de culture pour la compréhension des mécanismes enzymatiques impliqués dans la dégradation du BaP. Les filtrats de culture sont récupérés et des lysats cellulaires sont produits à partir des biomasses correspondantes afin d'effectuer des dosages colorimétriques d'activités enzymatiques extra- et intracellulaires. Les enzymes étudiées ont été sélectionnées du fait de leur implication connue dans la dégradation des HAP ou pour leur rôle de détoxification des espèces réactives de l'oxygène.

Durant la troisième étape, les résultats des expériences précédentes permettent la sélection des 3 souches les plus intéressantes du point de vue de leurs capacités métaboliques pour les phases d'étude en microcosmes de sol au laboratoire. Les sols utilisés correspondent à deux des échantillons de sols industriels dont la caractérisation est décrite dans le chapitre I (échantillons B2 et C6). Ces expériences visent à évaluer l'influence de l'inoculation d'une souche fongique sur la dégradation des HAP en sols historiquement contaminés. Cette démarche de bioaugmentation a également été couplée à des essais de biostimulation dans le cas de l'inoculation d'une souche autochtone.

Tableau II 1: Sélection des souches lors des étapes de la démarche expérimentale

		Souche															
		Expérience	S19	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Milieu Minéral	Désorption du BaP	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Dégradation du BaP	✓				✓	✓		✓						✓		
	Activités enzymatiques	✓				✓	✓		✓						✓		
Sol	Dégradation en sols contaminés	✓					✓										

		Souche															
		Expérience	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Milieu Minéral	Désorption du BaP	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Dégradation du BaP				✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓			✓
	Activités enzymatiques				✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓			✓
Sol	Dégradation en sols contaminés				✓												

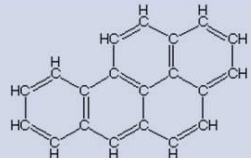
Matériels et méthodes

1. Produits chimiques

1.1. Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

Le BaP (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) est un HAP de haute masse molaire (252,3 g.mol⁻¹, 5 cycles) à la solubilité aqueuse très faible (3.10⁻³ mg.L⁻¹ à 25°C ; INERIS, 2006). La présence de plusieurs cycles aromatiques (tableau II 2) confère à cette molécule des capacités de fluorescence (excitation 295 nm, émission 403 nm) qui sont utilisées ici pour le dosage du BaP en spectrofluorimétrie.

Tableau II 2: Propriétés physico-chimiques du Benzo[a]pyrène (INERIS, 2006)

Nom	Nb de cycles	Structure	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Log Kow	Solubilité aqueuse (mg.L ⁻¹)
Benzo[a]pyrène (BaP)	5		252,3	6,0	0,003 (25°C)

1.2. Solvants

L'acétone qualité HPLC (Panreac Química S.A., Barcelone, Espagne) est utilisée pour réaliser les solutions mères de BaP. Le dichlorométhane et le méthanol qualité HPLC (Fisher Scientific SAS, Illkirch Cedex, France) sont utilisés pour les étapes d'extraction.

1.3. Réactifs des tests d'activités enzymatiques

L'ensemble des réactifs nécessaires à la production des lysats cellulaires et aux dosages d'activités enzymatiques par colorimétrie sont obtenus auprès de Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Pour chaque test, les réactifs sont préparés dans les tampons détaillés ultérieurement dans le paragraphe 3.5.

2. Etudes en milieu minéral

2.1. Milieus de culture

Les souches de la mycothèque (chapitre I) sont conservées sur milieu solide composé d'agar à l'extrait de malt (MEA):

Extrait de malt (Fluka Analytical)	20 g.L ⁻¹
Extrait de levure (Fisher Scientific)	2 g.L ⁻¹
Agar (Fisher Scientific)	15 g.L ⁻¹

Le milieu minéral utilisé (MM1) de pH 5,5 non tamponné est constitué des macroéléments suivants:

KCl	0,250 g.L ⁻¹
NaH ₂ PO ₄ . 2 H ₂ O	1,544 g.L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄ . 2 H ₂ O	0,008 g.L ⁻¹
MgSO ₄	0,244 g.L ⁻¹
NO ₃ NH ₄	1,000 g.L ⁻¹

Auxquels on ajoute une solution d'oligoéléments avec comme concentrations finales:

ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	1,0 mg.L ⁻¹
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	0,1 mg.L ⁻¹

FeSO ₄ . 7 H ₂ O	1,0 mg.L ⁻¹
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,5 mg.L ⁻¹
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,1 mg.L ⁻¹
MoO ₃	0,2 mg.L ⁻¹

Un volume de solution mère stérile de glucose (500 g.L⁻¹) est ajouté après autoclavage de sorte à obtenir une concentration finale de 20 g.L⁻¹.

2.2. Inoculation des milieux de culture et conditions d'incubation

Les milieux solides sont inoculés par transfert d'un explant de mycélium prélevé à partir d'une culture sur milieu solide préexistante. L'incubation a lieu en étuve thermostatée avec une température de 22°C et une photopériode de 12h/12h.

Pour inoculer les milieux liquides, une suspension de spores de la souche fongique étudiée est réalisée dans un mélange d'eau distillée et de Tween 80 à 0,1% par rinçage d'une pré-culture de 30 jours sur milieu solide MEA. Un comptage en cellule de Malassez au microscope optique (Axiostar plus HBO 50/AC, x400) permet la détermination de la concentration en spores. Les volumes d'inoculation sont calculés afin d'obtenir une concentration finale dans le milieu de 10⁴ spores.mL⁻¹. Dans le cas de souches non sporulantes, l'inoculation se fait par ajout dans le milieu liquide de 5 explants de mycélium prélevés à l'emporte-pièce (Ø 7 mm). L'incubation des cultures inoculées est réalisée à température ambiante et sous une agitation orbitale de 160 rpm.

2.3. Etude de la désorption du BaP par les filtrats de culture

Les capacités des différentes souches fongiques à excréter des molécules augmentant la solubilité aqueuse du BaP par une activité surfactante sont évaluées lors de cette expérience. L'étude est réalisée en erlenmeyer de 100 mL contenant 25 mL de MM1 avec 20 g.L⁻¹ en glucose. Le protocole suivi pour le test de désorption est celui mis au point par Rafin *et al.* (2013). Après 5 jours d'incubation, les cultures sont filtrées sur papier-filtre séchés et préalablement tarés (Fisherbrand, Ø 55 mm, 25 µm de porosité) avec un entonnoir Büchner monté sur fiole à vide, et les filtrats récupérés sont utilisés pour les expériences de solubilisation du BaP. Les biomasses sont pesées (Precisa XT220A, limite de détection 0,0001 g) après 24 h de séchage à l'étuve (60°C). Pour les tests de désorption, 15 µg de BaP

sont déposés en tubes à hémolyse par évaporation d'une solution mère à 40 mg.L⁻¹ (qsp méthanol). 3 mL de filtrat précédemment obtenu sont mis au contact du BaP et laissés équilibrer 24 h à température ambiante. La concentration de BaP désorbée dans le filtrat est ensuite mesurée par spectrofluorimétrie à 295 nm (Cary Eclipse, Varian). Le blanc utilisé est le filtrat de chaque culture sans mise en contact préalable avec le BaP. Les concentrations en BaP sont alors calculées à partir des fluorescences mesurées par comparaison avec la valeur d'un standard en eau distillée (solubilité aqueuse du BaP = 3 µg.L⁻¹).

$$c = [(I_{\text{test}} - I_{\text{blanc}}) / I_{\text{standard}}] \times 3$$

c = concentration en BaP (µg.L⁻¹)
I = intensité de fluorescence (U.A.)

Ce test de désorption est réalisé en triplicata pour chaque souche. Les résultats sont représentés sous la forme des concentrations moyennes de BaP désorbé pour chaque triplicata et les écarts types sont symbolisés par des barres d'erreur.

2.4. Etude de la capacité des souches à dégrader le BaP

Les 14 souches sélectionnées sont testées pour leur capacité à dégrader le BaP en milieu minéral. Une quantité initiale de 500 µg de BaP est introduite dans des erlenmeyers de 100 mL sous la forme d'une solution mère à base d'acétone (0,8 g.L⁻¹). Après évaporation du solvant à l'étuve (40°C), 25 mL de MM1 sont ajoutés avant stérilisation par autoclave. L'inoculation des différentes souches est ensuite réalisée selon les méthodes décrites dans le paragraphe 3.2.

Après 9 jours d'incubation, les cultures (biomasses et milieux) sont congelées et lyophilisées (Alpha 2-4 LD plus, Bioblock Scientific) durant 4 jours. Le BaP associé aux biomasses fongiques est ensuite extrait en appareil de Soxhlet pendant 17 h avec 175 mL de dichlorométhane. L'extrait obtenu est concentré sous vide à 42°C en évaporateur rotatif (Laborota 4003, Heidolph Instruments). Parallèlement le BaP restant dans l'erlenmeyer est récupéré avec du dichlorométhane:méthanol (1:1) et ajouté à l'extrait concentré. Après une nouvelle étape de concentration, l'extrait est récupéré dans 20 mL de dichlorométhane:méthanol (1:1) et filtré à 0,45 µm (filtres PTFE) avant mesure en chromatographie liquide à haute performance (HPLC Waters 600 Controller). Le système contient une colonne greffée en C18 Waters XTerra[®], 5 µm et un détecteur Waters 996 Photo

Diode Array Detector. La phase mobile utilisée est composée d'un mélange acétonitrile:eau (90:10 v/v) à concentration isocratique et le débit imposé est de 1 mL.min⁻¹. L'intégration de l'aire des pics obtenus à 380 nm permet de calculer les concentrations correspondantes par comparaison à des standards.

Ce protocole d'extraction est appliqué en parallèle à des témoins dans le but de mesurer les pertes abiotiques en BaP. Dans ce cas, le milieu est d'abord incubé sans mycélium durant 9 jours afin de tenir compte des dégradations abiotiques du BaP. Puis une culture fongique de 9 jours est introduite extemporanément avant lyophilisation afin d'évaluer les quantités de BaP non extractibles par adsorption au mycélium. Ce témoin extraction est réalisé pour chaque souche fongique.

Les valeurs obtenues lors de ces expériences permettent de calculer les pourcentages de biodégradation de la quantité initiale de BaP introduit (formule ci-après). Ces taux sont calculés à partir des quantités restantes de BaP en tenant compte des pertes abiotiques et des pertes par adsorption sur le mycélium. Les écarts types internes à chaque triplicata sont représentés sous la forme de barres d'erreur.

$$\% \text{ dégradé} = [(m_{EC} - m_T) / m_{EC}] \times 100$$

m_{EC} = quantité de BaP dans les cultures témoins

m_T = quantité de BaP dans chaque traitement

2.5. Activités enzymatiques associées à la dégradation du BaP

Ces expériences visent à mesurer les activités d'enzymes connues pour leur implication directe dans la dégradation des HAP ou pour la détoxification d'espèces réactives de l'oxygène elles-mêmes capables d'oxyder les HAP. L'objectif est ainsi de voir s'il existe un lien entre les capacités de dégradation du BaP des souches étudiées et ces différentes activités enzymatiques. Des tests colorimétriques sont menés à partir de cultures des 14 souches sélectionnées et incubées en présence ou en absence de BaP. Les conditions de culture sont les mêmes que pour les expériences de dégradation du BaP en milieu minéral. Les activités enzymatiques sont représentées sous la forme d'analyses en composantes principales (ACP) et d'histogrammes reprenant les valeurs moyennes des triplicatas de mesure et leurs écarts types.

2.5.1. Obtention des filtrats de cultures et production des lysats cellulaires

Après 9 jours d'incubation en MM1, les cultures en présence et en absence de BaP sont filtrées sur papier-filtre (Fisherbrand, Ø 55 mm, 25 µm de porosité) avec un entonnoir Büchner monté sur fiole à vide. Les filtrats de cultures sont alors récupérés et congelés à -20°C. Les biomasses sont rincées à l'eau et au tampon de lyse (0,25 M saccharose, 5 mM EDTA, 0,15% BSA, pH 7,5) puis sont broyées selon la méthode décrite par Krumova *et al.* (2009). Pour 10 g de masse fraîche, 5 g de sable de quartz et 20 mL de tampon de lyse avec 0,3 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (un inhibiteur des protéases à sérine) sont ajoutés dans un mortier. Après 2 minutes de broyage, 10 mL du tampon de lyse avec l'inhibiteur de protéases sont ajoutés. Le broyat récupéré est centrifugé 3 fois 15 minutes à 1500 g afin d'éliminer les débris cellulaires et le sable de quartz. Le surnageant est ensuite repris et centrifugé 30 minutes à 1500 g. La fraction liquide obtenue, qui constitue le lysat cellulaire, est conservée par congélation à -20°C.

2.5.2. Mesure colorimétrique des activités enzymatiques

Les protocoles de mesure d'activités enzymatiques sont adaptés à la microméthode afin d'augmenter le débit de mesure. La microméthode consiste en l'adaptation des volumes réactionnels aux puits d'une microplaque afin d'augmenter le nombre de mesures d'absorbance réalisées simultanément. Ces expériences ont été menées au sein du laboratoire Ecologie du Système Plante-Sol/Mycologie de l'Institut d'Ecologie des Sols (Munich, Allemagne) qui possède l'expérience des mesures colorimétriques d'activités enzymatiques en microméthode (Pritsch *et al.*, 2004). Chaque mesure d'activité enzymatique est réalisée en triplicata par une cinétique de 5 min en microplaque de 96 puits avec un spectrophotomètre SpectraMax 190. Les données sont récupérées et traitées avec le logiciel SoftMax[®] Pro afin d'obtenir les vitesses initiales de réaction. Les concentrations en protéines totales des filtrats et lysats sont déterminées par la méthode de Bradford (1976) afin de calculer les activités enzymatiques spécifiques.

$$AS = (V \times dA) / (\epsilon \times l \times 60 \times m_{\text{prot}})$$

AS = activité enzymatique spécifique (µkat.mg⁻¹)

dA = variation d'absorbance (min⁻¹)

ε = coefficient d'extinction molaire (µM⁻¹.cm⁻¹)

l = épaisseur de liquide (cm)

m_{prot} = quantité de protéines totales (mg)

V = volume réactionnel (L)

Les protocoles suivants décrivent les réactions colorimétriques utilisées pour la mesure des différentes activités enzymatiques étudiées. Dans chaque cas, le dernier réactif de la liste est celui qui déclenche la réaction.

2.5.3. Quantification de l'activité de type manganèse-peroxydase

Le principe de la mesure est de quantifier l'activité des peroxydases totales puis des peroxydases indépendantes du manganèse afin d'en déduire l'activité manganèse-peroxydase (Mn POX) par différence. Cette activité est mesurée ici sur les filtrats de culture ou les lysats cellulaires des différentes souches étudiées. Comme décrit par Ngo et Lenhoff (1980), l'activité correspond à la vitesse d'apparition d'un produit coloré bleu, l'indamine, suite au couplage oxydatif des réactifs 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) et diméthylaminobenzène (DMAB) par les peroxydases en présence de peroxyde d'hydrogène (figure II 2). La réaction est d'abord menée en présence de manganèse afin d'obtenir l'activité des peroxydases totales, puis en son absence pour mesurer l'activité des peroxydases autres que les manganèse-peroxydases. La formation du produit coloré est suivie par spectrophotométrie à 620 nm (coefficient d'extinction molaire = $13,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

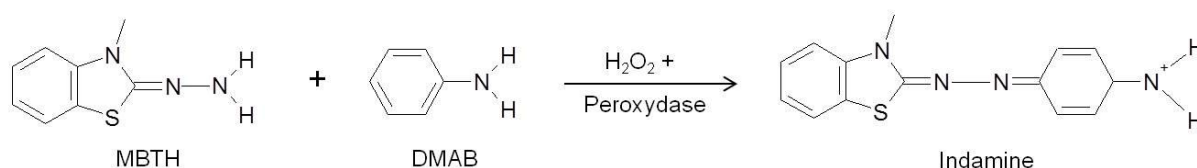


Figure II 2: Réaction colorimétrique de mesure des activités de type peroxydase

Le mélange réactionnel par puits est le suivant :

- Peroxydases totales

Tampon succinate-lactate (0,1 M ; pH 4,5)	150 μL
DMAB (25 mM)	20 μL
MBTH (1 mM)	10 μL
Mn SO ₄ . H ₂ O (2 mM)	10 μL
H ₂ O ₂ (1 mM)	10 μL
Echantillon étudié	100 μL

- Autres peroxydases

Tampon succinate-lactate (0,1 M ; pH 4,5)	150 μ L
DMAB (25 mM)	20 μ L
MBTH (1 mM)	10 μ L
EDTA (2 mM)	10 μ L
H ₂ O ₂ (1 mM)	10 μ L
Echantillon étudié	100 μ L

2.5.4. Dosage des activités lignine-peroxydase

La méthode décrite par Archibald (1992) consiste à mesurer la disparition du réactif coloré Azur B (figure II 3) suite à son oxydation par les lignines-peroxydases (Ln POX). Les réactions catalysées par les filtrats de culture et les lysats cellulaires sont suivies par spectrophotométrie à 651 nm ($\epsilon = 156 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

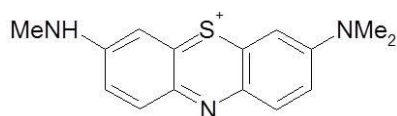


Figure II 3: Formule développée de la structure moléculaire de l'Azur B

Le mélange réactionnel par puits est le suivant :

Tartrate de sodium (50 mM ; pH 4,5)	194 μ L
H ₂ O ₂ (10 mM)	3 μ L
Azur B (0.11% w/v)	3 μ L
Echantillon étudié	100 μ L

2.5.5. Mesure des activités laccase

L'oxydation du 2,2-azino-bis-[3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulphonique] (ABTS ; figure II 4) par les laccases forme un produit coloré vert (Wolfenden et Willson, 1982). La mesure des activités laccases des filtrats et les lysats cellulaires s'effectue à 425 nm ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

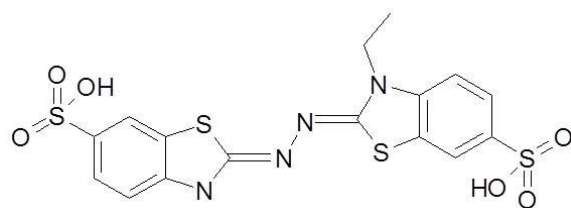


Figure II 4: Formule développée de la structure moléculaire de l'ABTS

Le mélange réactionnel par puits est le suivant :

Tampon citrate-phosphate (0,1 M ; pH 5)	150 μ L
ABTS (0,08% w/v)	50 μ L
Echantillon étudié	100 μ L

2.5.6. Dosage de l'activité époxydase du cytochrome P450

La réaction colorimétrique décrite par Alcalde *et al.* (2004) se déroule en deux temps (figure II 5). Il y a d'abord la production de l'oxyde de styrène à partir du styrène par l'activité époxydase du cytochrome P450. Puis l'oxyde de styrène obtenu réagit chimiquement avec la γ -(4-nitrobenzyl)pyridine (NBP) ce qui conduit à l'apparition d'un chromophore violet. La réaction produite par les lysats cellulaires est suivie à 600 nm et les concentrations sont obtenues par réalisation d'une gamme étalon d'oxyde de styrène.

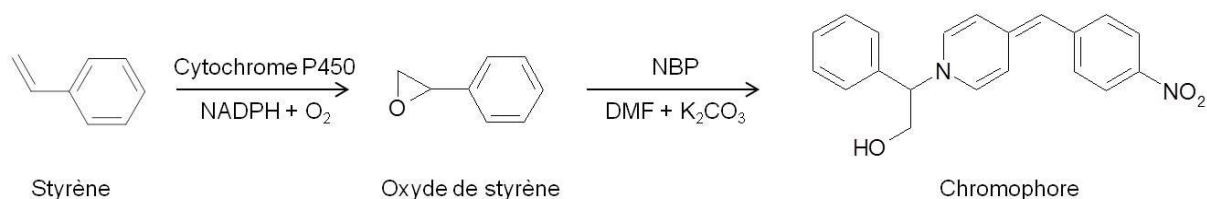


Figure II 5: Formule développée de la réaction colorimétrique catalysée par l'activité époxydase du cytochrome P450

Le mélange réactionnel par puits est le suivant :

Lysat cellulaire	10 μ L
Tampon phosphate (0,1 M ; pH 8)	70 μ L
Styrène (100 mM en méthanol)	10 μ L
NADPH (20 mM)	10 μ L
5 min à température ambiante	
NBP (4% w/v en éthanol)	25 μ L

30 min à 80°C

10 min sur glace

DMF (Diméthylformamide) 150 µL

K₂CO₃ (1M) 25 µL

2.5.7. Quantification des activités catéchol 1,2- et 2,3-dioxygénases

Le protocole décrit par Spain et Nishino (1987) consiste en la détection du produit de dégradation du catéchol qui est l'acide cis-cis-muconique (absorbance à 260 nm, $\epsilon = 16 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) dans le cas de la catéchol 1,2-dioxygénase et le semialdéhyde 2-hydroxymuconique (absorbance à 375 nm, $\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) dans le cas de la catéchol 2,3-dioxygénase (figure II 6).

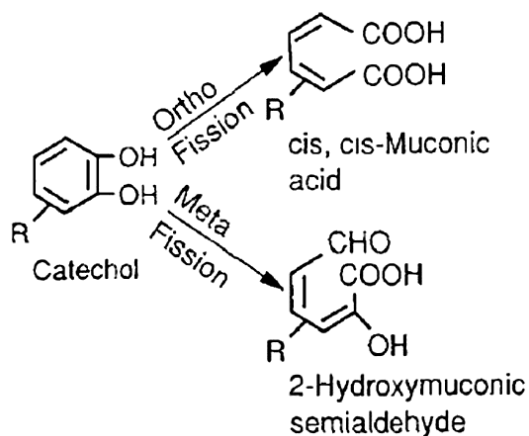


Figure II 6: Réaction d'ouverture de cycle catalysée par les catéchol 1,2- (position ortho) et 2,3-dioxygénases (position méta)

Le mélange réactionnel par puits est le suivant :

- Catéchol 1,2-dioxygénase

Tampon sodium phosphate (87 mM ; pH 7,5) 100 µL

EDTA (3,57 mM) 84 µL

Catéchol (1,875 mM) 16 µL

Lysat cellulaire 100 µL

- Catéchol 2,3-dioxygénase

Tampon sodium phosphate (87 mM ; pH 7,5)	184 μ L
Catéchol (1,875 mM)	16 μ L
Lysat cellulaire	100 μ L

2.5.8. Dosage de l'activité superoxyde dismutase

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) se mesure via l'inhibition de l'oxydation du nitro bleu de tétrazolium (NBT) par les radicaux superoxydes résultant de l'activité de la xanthine oxydase (Beauchamps et Fridovich, 1971). Les vitesses d'oxydation catalysées par une quantité déterminée de xanthine oxydase sont comparées en présence et en absence de lysat cellulaire, et l'activité de la superoxyde dismutase est calculée en fonction du pourcentage d'inhibition de la réaction (figure II 7). L'activité de la superoxyde dismutase est donc obtenue par la différence de vitesse de disparition du réactif coloré NBT due à la dismutation des radicaux superoxydes générés par la xanthine oxydase (absorbance à 560 nm, $\epsilon = 15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

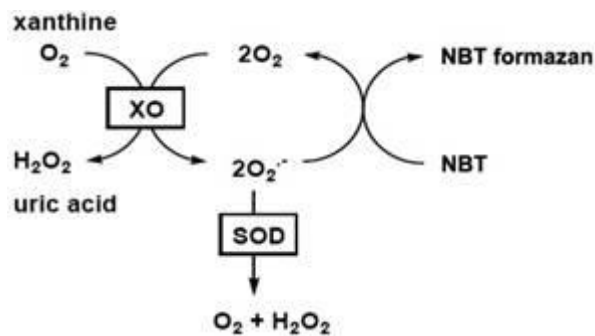


Figure II 7: Schéma de la réaction colorimétrique permettant la mesure de l'activité superoxyde dismutase

Le mélange réactionnel par puits est le suivant :

Solution A	280 μ L
Tampon carbonate de sodium (50 mM ; pH 10,2)	
Xanthine (0,1 mM)	
NBT (0,025 mM)	
EDTA (0,1 mM)	
Solution B	10 μ L

Sulfate d'ammonium (2M)	
EDTA (1 mM)	
Xanthine oxidase ($\approx 0,015 \text{ min}^{-1}$)	
Lysat cellulaire	10 μL

Les solutions A et B sont mélangées extemporanément avec les lysats cellulaires.

2.5.9. Mesure de l'activité glutathion peroxydase

Selon la méthode décrite par Dixon *et al.* (1998), l'activité de la glutathion peroxydase (GPOX) se mesure directement par la consommation du NADPH qui absorbe à 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Le mélange réactionnel par puits est le suivant :

Lysat cellulaire	10 μL
Tampon potassium-phosphate (50 mM)	
+ Na ₄ EDTA (2,5 mM ; pH 7)	50 μL
GSH (100 mM)	10 μL
Glutathion reductase (1,966% w/v)	10 μL
NADPH (2,8 mM)	10 μL
H ₂ O ₂ (90 mM)	10 μL

2.5.10. Quantification de l'activité catalase

Selon la méthode de Li et Schellhorn (2007), la consommation du peroxyde d'hydrogène par la catalase peut être suivie directement à 240 nm ($\epsilon = 43,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Le mélange réactionnel par puits est le suivant :

Lysat cellulaire	50 μL
H ₂ O ₂ (5 mM) en tampon phosphate (0,05M ; pH 7)	250 μL

2.5.11. Dosage de l'activité glucose-6-Phosphate déshydrogénase

La formation du NADPH par la réaction catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) est mesurée directement à 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) d'après la technique décrite par Deutsch (1983).

Le mélange réactionnel par puits est le suivant :

H ₂ O	145 μL
NADP ⁺ (3,8 mM)	25 μL
Tris-HCl Buffer (0,5 M ; pH 7,5)	25 μL
MgCl ₂ (0,63 M)	25 μL
Glucose-6-Phosphate (33 mM)	25 μL
Maleimide (150% w/v)	50 μL
Lysat cellulaire	5 μL
3-5 min d'incubation avant mesure	

Le maleimide est un inhibiteur des 6-phosphogluconate-déshydrogénases endogènes qui pourraient gêner le test colorimétrique par la production de NADPH.

3. Expériences de dégradation des HAP en sols historiquement contaminés

Suite aux expériences en milieu minéral, la souche S19 ainsi que deux souches de la mycothèque sont sélectionnées pour une étude de dégradation des HAP en échantillons de sols présentant une contamination historique. Ces sols ne sont pas stérilisés afin d'en préserver la microflore endogène. Les expériences sont menées en laboratoire dans des échantillons prélevés sur des sites industriels (chapitre I).

3.1. Choix des sols, des souches et préparation de l'inoculum

Les souches sélectionnées pour ces phases expérimentales sont la souche S19, la souche 5 et la souche 18. Les sols utilisés sont les sols B2 et C6. Ces choix sont expliqués dans le paragraphe 3 des résultats et discussion.

Les souches sont incubées 10 jours dans 25 mL de MM1 contenant 20 g.L⁻¹ de glucose en présence d'un matériel porteur afin d'y permettre le développement mycélien. Ce matériel

est constitué de granules d'argile expansée réalisés par l'entreprise Seramis® lors d'une production prototypale. Ces granules présentent en effet une porosité supérieure aux productions commercialisées (valeurs non disponibles). Une expérience préliminaire a permis d'adapter au modèle fongique le protocole d'inoculation sur ce matériel porteur développé initialement avec des souches bactériennes. Les conditions de culture et le temps d'incubation nécessaire à l'installation mycélienne ont ainsi été déterminés. L'observation des cultures a montré que le mycélium de différentes souches se développe de manière apparemment plus importante à la surface du matériel prototype qu'à la surface du matériel commercialisé. C'est ainsi que le matériel porteur non commercialisé a été choisi pour les expériences de dégradation en sol.

3.2. Conditions d'incubation

Les incubateurs sont constitués de flacons de 250 mL en verre teinté fermés de bouchons en caoutchouc (figure II 8).

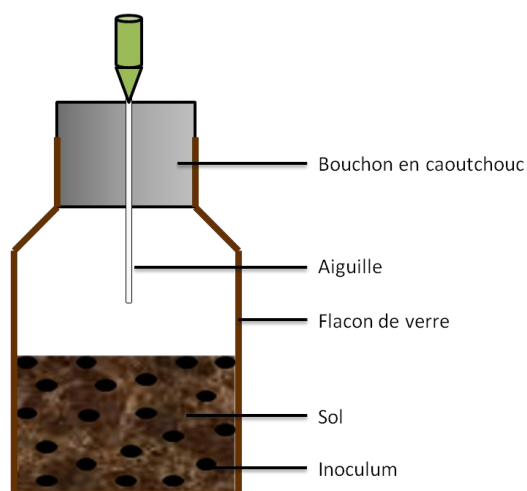


Figure II 8: Schéma d'un incubateur pour les expériences d'inoculation en sol

Le renouvellement en air est réalisé par une aiguille transperçant le bouchon et par une ouverture de 3 minutes 3 fois par semaine. Chaque incubateur contient l'équivalent de 120 g de masse sèche de sol humidifié à sa teneur hydrique optimale (chapitre I), mélangé à 20 granules de matériel porteur inoculé, et densifié à $1,3 \text{ g.cm}^{-3}$. L'incubation a lieu dans l'obscurité à température ambiante sur une période de 30 jours.

3.3. Paramètres testés

Le tableau II 3 reprend les différentes conditions testées lors de cette expérience.

Tableau II 3: Plan expérimental de l'expérience de dégradation des HAP en sols historiquement contaminés (valeurs = nombres de réplicatas par condition)

Souches \ Sol	Bioaugmentation		Bioaugmentation/Biostimulation		
	B2	C6	C6 + N/P	C6 + C/N/P	C6 + O ₂
Témoin	2	2	X	X	X
S19	3	3	X	X	X
5	3	3	X	X	X
18	3	3	3	3	3

Les incubateurs témoins sont constitués de l'échantillon de sol mélangé selon la méthode décrite précédemment (§ 3.2) à 20 granules de matériel porteur non inoculés, mais imprégnés durant 24h dans le milieu servant à l'installation mycélienne (MM1 à 20 g.L⁻¹ de glucose). Les essais de bioaugmentation concernent les souches S19, 5 et 18 inoculées en triplicata dans les sols B2 et C6. Les expériences de couplage bioaugmentation/biostimulation sont réalisées avec la souche 18 dans son sol d'origine (C6). Trois traitements sont étudiés : l'enrichissement du sol avec deux compositions différentes de nutriments et l'augmentation de l'aération du sol. Le premier type d'enrichissement en nutriments est réalisé lors de l'hydratation des échantillons à leur teneur hydrique optimale par l'utilisation d'une solution de nitrate d'ammonium et de phosphate de sodium. La concentration de cette solution permet d'abaisser le ratio C/N du sol (chapitre I) à une valeur de 17. Un ratio N/P de 15 est établi au sein de la solution. Le choix de ces valeurs est justifié dans le paragraphe 3.1 de "résultats et discussion". Le pH de la solution est fixé à celui du sol C6 (pH 8,9) de sorte à réduire le nombre de sources de variation. Le second traitement couple l'ajout d'une source de carbone facilement assimilable à l'enrichissement en azote et phosphate. Pour cela, une concentration de 10 g.L⁻¹ de glucose est établie dans la solution de nitrate d'ammonium et de phosphate de sodium décrite précédemment. Concernant le troisième traitement, l'aération du sol est réalisée par homogénéisation de l'échantillon à la spatule une fois par semaine.

3.4. Extraction et dosage chromatographique

Après 30 jours d'incubation, 23 g de sol équivalent masse sèche sont prélevés pour chaque incubateur et séchés 1 semaine sous hotte chimique. 20 g de chaque échantillon sont utilisés pour l'extraction par l'appareil de Soxhlet avec 175 mL de dichlorométhane pendant 17 h et 2 g pour l'évaluation de l'humidité résiduelle. Les extraits sont concentrés à 100 mL

sous flux d'azote puis les concentrations des 16 HAP US EPA sont déterminées par mesure en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Trace GC ULTRA system (Thermo Scientific) équipée d'une colonne capillaire NMTR-5MS (30 m x 0.25 mm) avec un détecteur DSQ II MS) selon les conditions décrites dans le chapitre I (volume injecté : 1 μL ; Injecteur splitless ; température injecteur : 295°C ; gradient de température : 70°C pendant 2 min, $30^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ jusque 150°C , $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ jusque 200°C , $4^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ jusque 310°C pendant 18 min ; ionisation par impact électronique à 70 eV et température de la source : 300°C ; détecteur en mode scan entre 50 et 500 unités de masse atomique).

Les pourcentages de dégradation obtenus sont calculés par rapport aux contrôles. Chaque condition ayant été réalisée en triplicata, les résultats sont exprimés sous la forme de moyennes et de leurs écarts types.

4. Traitements statistiques

Le test t non apparié de Student a été utilisé afin de distinguer les moyennes significativement différentes au seuil de risque de 5%. Des lettres permettent de distinguer les groupes statistiquement différents au sein des représentations graphiques.

Les ACP sont représentées selon les axes présentant la plus grande contribution relative. Les souches présentant un taux de dégradation supérieur à 10% en moyenne lors du screening sont signalées comme efficaces, contrairement à celles dont le taux de dégradation ne dépasse pas cette valeur.

Résultats et Discussion

1. Capacités de désorption et de dégradation du BaP par les isolats

1.1. Etude de la désorption du BaP par les filtrats de culture

La mesure par spectrofluorimétrie UV des filtrats de culture mis au contact de 15 μg de BaP pendant 24 h permet d'obtenir les concentrations présentées par la figure II 9.

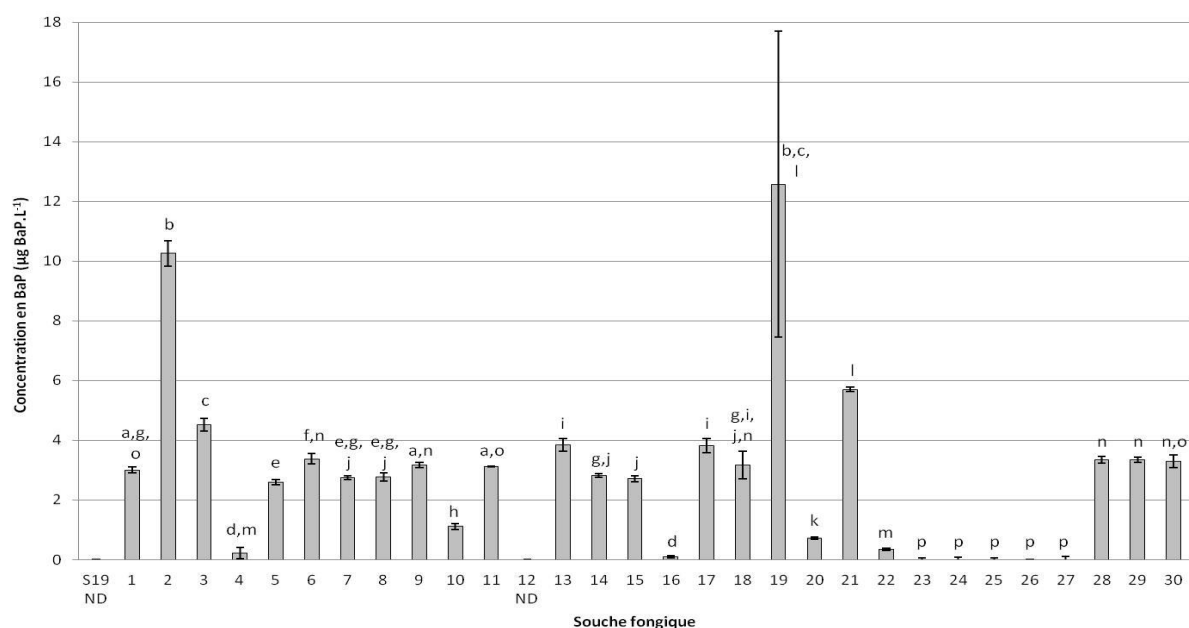


Figure II 9: Concentrations aqueuses en BaP solubilisées par les filtrats de culture après 24h à température ambiante (ND = non déterminé)

Les deux souches signalées comme "non déterminé" produisent un pigment perturbant la mesure spectrofluorimétrique. La majorité des filtrats présente une concentration en BaP désorbé et solubilisé en phase aqueuse inférieure ou égale à la solubilité aqueuse de cet HAP ($3 \mu\text{g.L}^{-1}$; INERIS, 2006). Cela signifie que la plupart des souches ne produisent pas de molécules extracellulaires capables d'augmenter la solubilisation du BaP dans les conditions expérimentales testées. Les concentrations inférieures à la solubilité aqueuse du BaP s'expliquent du fait de la diminution du pouvoir de solvatation de l'eau lorsqu'elle contient d'autres solutés comme les phosphates entrant dans la composition du milieu MM1. Seules les souches 2, 3, 19 et 21 présentent des quantités solubilisées de BaP significativement supérieures aux autres filtrats. Cependant, les souches 2 et 3 présentent des biomasses très faibles dans les conditions expérimentales choisies et ne sont pas sélectionnées pour la suite des expérimentations. Il est à noter que la souche 19 est identifiée en tant que *Fusarium oxysporum* et que cette espèce est déjà décrite pour ses capacités de solubilisation du lignite (Hölker *et al.*, 1995). Ces résultats concordent également avec une autre étude (Rafin *et al.*, 2013) qui souligne les capacités de désorption du BaP de *Fusarium oxysporum* et de *Bionectria ochroleuca* de la même espèce que les souches 19 et 21 respectivement dans ce travail de thèse. L'augmentation de la solubilité aqueuse apparente du BaP pourrait être liée à la production de molécules à activité surfactante par ces souches. Cette propriété est particulièrement intéressante pour l'augmentation de la biodisponibilité des HAP qui représente l'un des facteurs limitant leur dégradation dans les sols. Le rôle des tensioactifs de

source biologique est en effet considéré très important dans les processus de bioremédiation (Ron et Rosenberg, 2002 ; Mulligan, 2005) et les souches bactériennes productrices de ces molécules sont déjà sélectionnées en fonction de cette capacité pour la bioremédiation des HAP en sol (Sun *et al.*, 2012). De telles molécules sont également décrites chez des souches fongiques filamenteuses (Paraszkiewicz *et al.*, 2002) et pourraient présenter un potentiel pour la bioremédiation fongique des hydrocarbures (Muriel *et al.*, 1996 ; Camargo-de-Morais *et al.*, 2003 ; Luna-Velasco *et al.*, 2007).

1.2. Etude de la capacité des souches à dégrader le BaP

Parmi les 30 souches utilisées pour le test de désorption, 14 sont choisies afin d'évaluer leurs capacités de dégradation du BaP. Ces souches ont été sélectionnées pour leur bon développement dans les conditions expérimentales choisies (MM1, 20 g.L⁻¹ en glucose), leurs capacités de désorption du BaP et afin de représenter une certaine diversité sur la base de critères morphologiques et d'identification (chapitre I). La figure II 10 présente les taux de dégradation obtenus après 9 jours d'incubation en présence de 500 µg de BaP dans un volume de 25 mL de MM1.

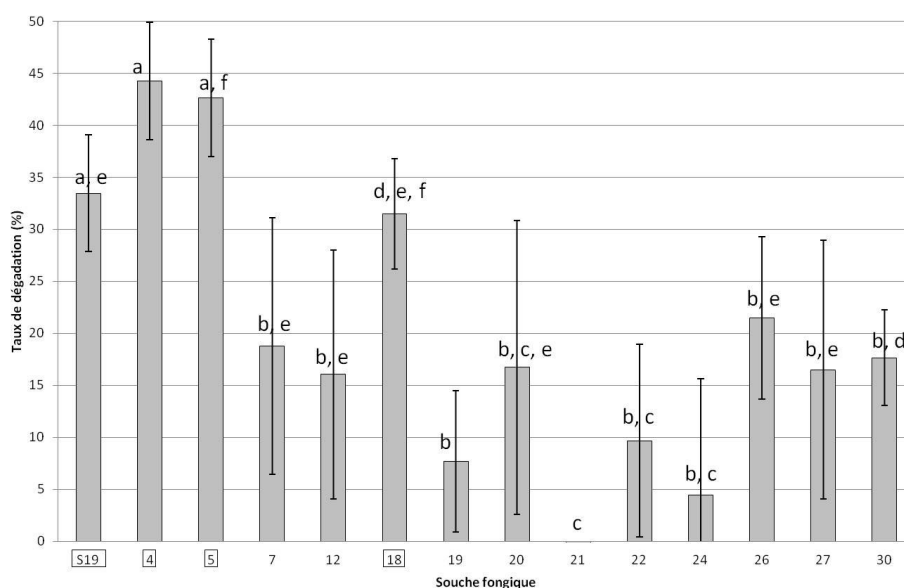


Figure II 10: Taux de dégradation d'une quantité initiale de 500 µg de BaP après 9 jours d'incubation dans 25 mL de MM1 (encadrées = souches présentant plus de 30% de dégradation du BaP en moyenne)

Les taux de dégradation obtenus présentent majoritairement une moyenne supérieure à 10%, ce qui représente une valeur relativement élevée au regard de la récalcitrance du BaP et d'un temps d'incubation court. Cependant seules les souches S19, 4, 5, 18, 26 et 30 présentent une dégradation significative par rapport aux témoins extraction. Rappelons l'intérêt des

témoins extraction qui représentent à la fois les dégradations abiotiques du BaP et les pertes liées à l'adsorption du BaP au mycélium et lors de la phase d'extraction. Le calcul des pourcentages de dégradation de chaque souche par rapport à leurs témoins respectifs nous permet ainsi de mesurer le taux de dégradation biotique.

Parmi les souches présentant une dégradation significative par rapport aux témoins, quatre souches présentent des moyennes particulièrement élevées. S19 (*Fusarium solani*) entraîne un taux de dégradation de 33,4% en accord avec les résultats de dégradation obtenus lors d'études précédentes (Rafin *et al.*, 2000 ; Veignie *et al.*, 2004). Concernant les souches de la mycothèque constituée dans le cadre de la thèse, les souches 4 et 5 présentent des dégradations très importantes de 44,2% et 42,6% respectivement. La souche 4 est identifiée en tant que *Penicillium canescens*, une espèce déjà décrite dans les processus de dégradation des biphényls (Schauer et Borriss, 2004) et du fluorène (Garon *et al.*, 2004). En outre le potentiel des souches du genre *Penicillium* est déjà reconnu dans le domaine de la bioremédiation notamment des HAP (Leitão, 2009). Sack et Günther (1993) ont d'ailleurs déjà montré que *Penicillium sp.* isolé d'un sol contaminé cométabolise plusieurs HAP avec des taux comparables aux champignons lignolytiques. La souche 5 est *Cladosporium cladosporioides* dont les propriétés de dégradation des HAP (Giraud *et al.*, 2001) et notamment du BaP (Passarini *et al.*, 2011) sont rapportées dans la littérature. Plus précisément, les taux de dégradation du BaP obtenus dans cette étude (Passarini *et al.*, 2011) sont de 30,9% et de 45,9% respectivement après 8 et 16 jours d'incubation avec une quantité initiale de 1 mg de BaP. Ces valeurs semblent cohérentes aux résultats de notre étude, bien que la comparaison soit rendue difficile par les différences de conditions d'incubation et l'expression des résultats en pourcentages de dégradation. La souche *Cladosporium cladosporioides* a d'ailleurs déjà été employée dans des expériences de dégradation des hydrocarbures dérivés du pétrole conduites en sol (Colombo *et al.*, 1996 ; Steliga *et al.*, 2012). La souche 18 se révèle également efficace avec une moyenne de 31,45% qui est comparable à celle de S19. L'identification de la souche 18 correspond à *Talaromyces helicus* qui est décrit pour ses capacités de dégradation des biphényls (Romero *et al.*, 2005 et 2006). Des souches de ce genre sont déjà décrites pour leur développement en présence de HAP (Chaillan *et al.*, 2004). Notamment *Talaromyces rotundus* a été montré capable de dégrader du BaP radiomarqué avec des taux de dégradation stimulés par la présence de *n*-hexadécane en tant que co-substrat (Romero *et al.*, 2010). Le stade conidial de *Talaromyces helicus* est

Penicillium helicum (Stolk et Samson, 1972), ce qui ramène aux potentialités du genre *Penicillium* en matière de bioremédiation (Leitão, 2009).

Deux souches présentent des taux moyens de dégradation plus faibles, mais significatifs par rapport aux témoins extraction : les souches 26 (21,5%) et 30 (17,65%). La souche 26 est identifiée en tant que *Trichoderma harzianum* qui a déjà été isolée à partir de sols industriels et étudiée pour ses propriétés de dégradation des HAP (Mahmood et Rama Rao, 1993 ; Colombo *et al.*, 1996 ; Saraswathy et Hallberg, 2002). La souche 30 correspond à *Mortierella alpina*, un champignon oléagineux étudié principalement pour ses facultés de production d'acides gras polyinsaturés (Sakuradani *et al.*, 2009). Cependant cette souche a récemment permis la description d'une nouvelle voie de dégradation des composés aromatiques (Wang *et al.*, 2013), et des souches du même genre sont rapportées capables d'utiliser des dérivés du pétrole en tant que source de carbone (Davies et Westlake, 1979 ; Hughes *et al.*, 2007).

Parmi les quatre souches générant les dégradations moyennes les plus faibles, il est intéressant de noter la présence des souches 19 et 21 qui possèdent des capacités de désorption du BaP supérieures aux autres souches testées. Cette observation souligne que ces deux propriétés ne semblent pas être corrélées de façon systématique dans les conditions expérimentales considérées. Ce résultat est particulièrement surprenant concernant la souche 19 qui est identifiée comme *Fusarium oxysporum*, cette espèce étant décrite comme efficace dans la dégradation de HAP (Oudot *et al.*, 1987 ; Cerniglia, 1997 ; Jacques *et al.*, 2007) dont le BaP (Verdin *et al.*, 2004 et 2005 b). L'identification des deux autres souches faiblement efficaces (22 et 24) comme étant du genre *Cladosporium* est également intéressant, car l'une des souches les plus efficaces (5) appartient à ce genre. L'efficacité de dégradation du BaP pourrait ainsi être propre au niveau de l'espèce, mais aussi s'expliquer par l'hétérogénéité du genre *Cladosporium* dont la classification a été établie majoritairement sur des critères morphologiques.

2. Activités enzymatiques associées à la dégradation du BaP

La démarche suivie au sein de ce paragraphe est constituée de deux étapes. Les niveaux d'activité enzymatique chez les souches étudiées en présence ou en absence de BaP sont d'abord analysés de manière globale par ACP dans le but de sélectionner les activités les plus informatives pour la compréhension du mécanisme de dégradation du BaP. Ces activités sont ensuite étudiées individuellement de manière plus précise.

2.1. Enzymes directement impliquées dans la dégradation des HAP

2.1.1. Corrélation entre capacités de dégradation du BaP et activités enzymatiques

Les activités enzymatiques sont responsables des propriétés métaboliques des microorganismes. Une corrélation est donc recherchée entre les taux de dégradation du BaP et les niveaux d'activités enzymatiques documentées pour leur implication dans la biodégradation des HAP (lignine-péroxydase, manganèse-péroxydase, laccase, catéchol 1,2 et 2,3 dioxygénases, cytochrome P450). La figure II 11 représente les activités des enzymes sélectionnées d'après la littérature chez les différentes souches en présence ou en absence de BaP.

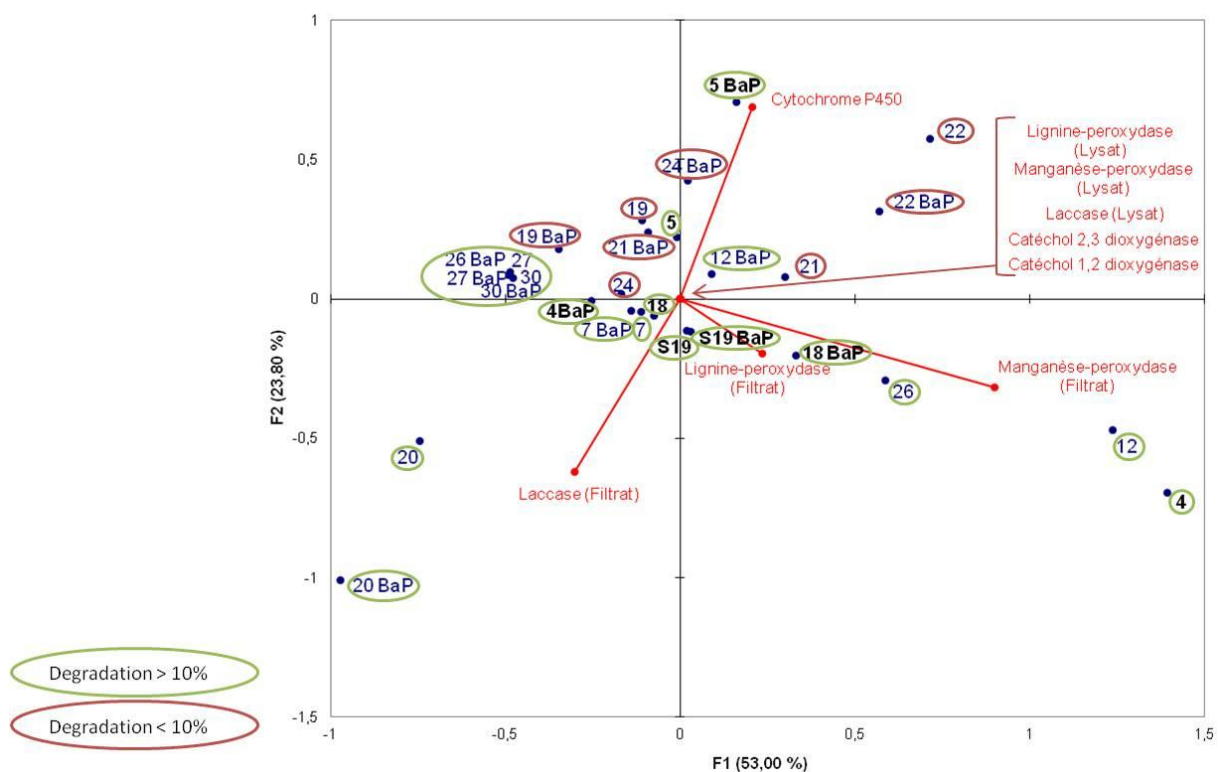


Figure II 11: Analyse en composantes principales sur matrice de covariance des activités enzymatiques de dégradation des HAP chez les différentes souches en présence ou en absence de 500 µg de BaP sur 9 jours (en noire = souches dont le taux de dégradation moyen du BaP dépasse 30%)

Cette ACP est réalisée à partir d'une matrice de covariance, ce qui est permis par l'utilisation d'une unité de mesure d'activités spécifiques commune ($\mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$). Cette forme d'ACP ne biaise pas les comparaisons de niveaux d'activité par une mise à l'échelle et permet d'évaluer l'implication des différentes enzymes dans la dégradation du BaP.

La longueur des vecteurs représente l'importance de chaque activité enzymatique dans la dispersion des différentes souches. Cette représentation graphique met en exergue la

prédominance des activités lignine-peroxydases (Ln POX), manganèse-peroxydases (Mn POX) et laccase des filtrats ainsi que l'activité époxydase du cytochrome P450 des lysats cellulaires dans les conditions expérimentales considérées. Les activités Ln POX, Mn POX et laccase des lysats sont très faibles dans cette étude, ce qui est cohérent avec l'excrétion généralement admise de ces enzymes (Juhasz et Naidu, 2000 a). Les activités dioxygénases sont très faibles ou absentes chez les souches testées dans les conditions expérimentales utilisées. Les activités les plus faibles (Ln POX, Mn POX et laccase des lysats cellulaires et dioxygénases) ne seront donc plus discutées par la suite.

L'angle entre les vecteurs permet de voir la corrélation des activités enzymatiques entre elles. Cela permet d'observer que les activités extracellulaires Ln/Mn POX et, dans une moindre mesure, laccase se retrouvent chez des mêmes souches. Au contraire, l'activité époxydase du cytochrome P450 présente un angle très important par rapport aux trois activités précédentes. Cette activité époxydase se retrouve ainsi chez d'autres souches qui présentent des activités extracellulaires Ln POX, Mn POX et laccase plus faibles (souches 5, 19, 21, 22 et 24).

Cette dispersion des souches d'après leurs activités enzymatiques en présence ou en absence de BaP peut également être couplée à leurs capacités de dégradation. Il ressort ainsi que la totalité des souches positionnées dans la partie inférieure du graphique selon l'axe y présentent des taux de dégradations moyens du BaP supérieurs à 10%. A l'inverse, l'ensemble des souches présentes dans la partie supérieure ne dépassent pas une moyenne de 10% de dégradation du BaP à l'exception de la souche 5 (*Cladosporium cladosporioides*). Cette corrélation semble impliquer un rôle des activités lignine-peroxydases, manganèse-peroxydase et laccase extracellulaires dans la dégradation du BaP chez les souches étudiées.

Les activités enzymatiques les plus informatives pour la compréhension du processus de dégradation du BaP sont étudiées plus spécifiquement afin de comprendre les variations entre souches et l'effet de la présence de BaP sur les niveaux d'activité.

2.1.2. Activités enzymatiques manganèse-peroxydase

La figure II 12 représente l'activité enzymatique spécifique de la manganèse-peroxydase exprimée en $\mu\text{kat}\cdot\text{mg}^{-1}$ chez les différentes souches.

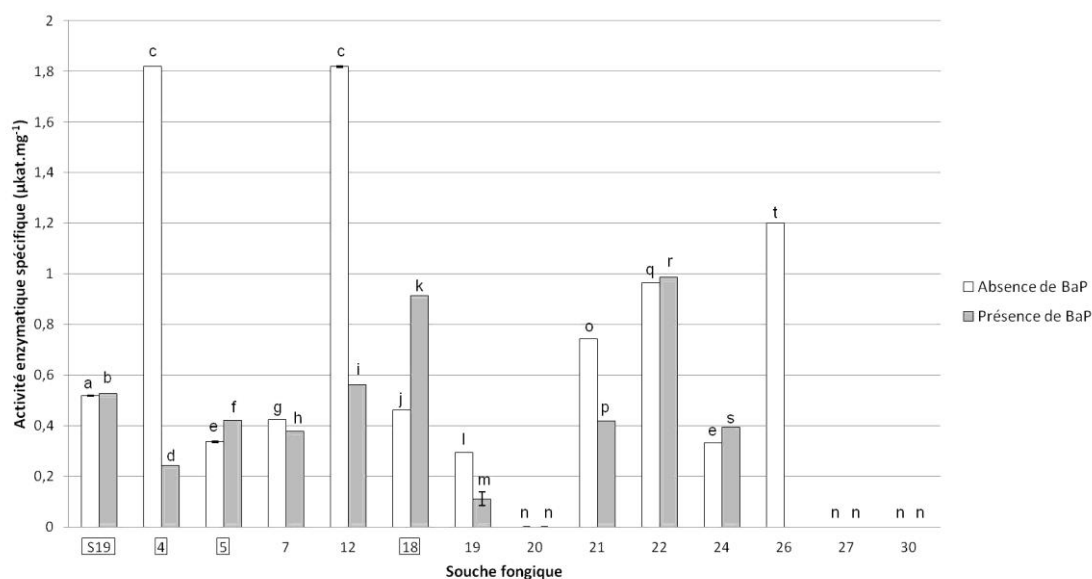


Figure II 12: Activités spécifiques de type manganèse-peroxydase dans les filtrats des souches sélectionnées après 9 jours de culture en présence ou en absence de BaP (encadrées = souches dont le taux de dégradation moyen du BaP dépasse 30%)

Plusieurs des souches présentent des activités enzymatiques spécifiques Mn POX élevées en absence de BaP, ce qui souligne la production constitutive de cette enzyme. En particulier, la souche 4 présente une activité très importante qui peut être mise en relation avec ses capacités de dégradation du BaP très élevées. L'ajout de BaP apparaît inhiber certaines activités enzymatiques spécifiques Mn POX et notamment dans le cas des souches présentant une activité élevée (souches 4, 12, 21 et 26). Ce phénomène pourrait s'expliquer par une interaction entre les molécules de BaP et cette enzyme qui perturberait son fonctionnement catalytique. La mesure d'une activité Mn POX chez la majorité des souches de la mycothèque est surprenante, car la production de ces enzymes est décrite comme étant spécifique à certaines familles fongiques appartenant aux Basidiomycètes (Janusz *et al.*, 2013). Ce résultat est très intéressant étant donné le potentiel de plus en plus reconnu des manganèse-peroxydases dans la remédiation des xénobiotiques récalcitrants (Durán et Esposito, 2000 ; Hofrichter, 2002 ; Gianfreda et Rao, 2004) et notamment des HAP (Librando et Pappalardo, 2013). Il est néanmoins important de considérer ces résultats d'activité Mn POX avec précaution. En effet l'oxydation du manganèse par réaction chimique avec des composés produits par les cellules peut potentiellement amener à des biais de mesure colorimétrique. Il serait ainsi intéressant de coupler ces mesures à la caractérisation du protéome par électrophorèse. Aucune activité manganèse-peroxydase n'est mesurée chez les souches 20, 27 et 30 en présence ou en absence de BaP. La présence d'un taux de dégradation

du BaP significatif chez la souche 30 (17,65%) souligne ainsi l'implication d'autres activités dans le mécanisme de dégradation du BaP.

2.1.3. Activités enzymatiques lignine-peroxydase

La figure II 13 présente l'activité enzymatique spécifique (en $\mu\text{kat}.\text{mg}^{-1}$) concernant les lignine-peroxydases extracellulaires.

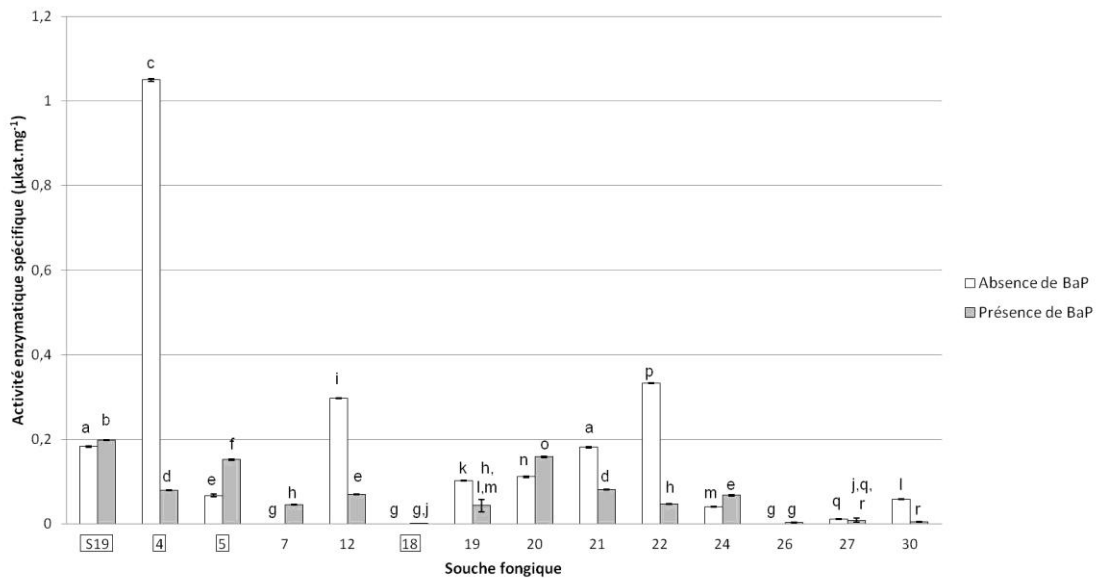


Figure II 13: Activités spécifiques de type lignine-peroxydase dans les filtrats de culture après 9 jours de culture en présence ou en absence de BaP (encadrées = souches dont le taux de dégradation moyen du BaP dépasse 30%)

Les activités les plus importantes en absence de BaP sont observées chez les souches 4, 12 et 22, mais semblent inhibées par la présence de BaP. Il en est de même pour les souches 19, 21 et 30. Chez d'autres souches (S19, 5, 7, 20 et 24), le BaP apparaît avoir un effet stimulateur sur les activités Ln POX. Ces résultats sont d'autant plus intéressants du fait que les lignine-peroxydases ne sont que très peu décrites chez le groupe des Ascomycètes (Rodriguez *et al.*, 1997) auquel appartient l'ensemble des souches étudiées mis à part la souche 30 (Zygomycète). Une forte corrélation est également à noter entre les activités Ln et Mn POX mesurées dans notre étude. Cette corrélation concerne les niveaux d'activité, mais aussi l'effet de l'ajout du BaP. En absence de BaP, des activités Ln POX importantes sont en effet retrouvées chez les souches présentant les activités Mn POX les plus élevées dans les mêmes conditions (4 et 12). De plus, l'ajout de BaP apparaît inhiber les activités enzymatiques Ln POX et Mn POX chez les mêmes souches (4, 12, 19 et 21), tandis que d'autres souches (S19, 5 et 24) ne présentent pas cet effet inhibiteur pour les deux types

d'activité. Cependant certaines souches ne présentent que l'une des activités (18, 20 et 26) et soulignent que la corrélation entre Ln et Mn POX n'est pas systématique.

La souche 20 présente également la particularité d'être la seule à posséder une activité laccase importante de 0,93 $\mu\text{kat}/\text{mg}$ augmentée significativement à 1,71 $\mu\text{kat}/\text{mg}$ en présence de BaP (figure non représentée).

2.1.4. Activités enzymatiques époxydase du cytochrome P450

La figure II 14 représente l'activité époxydase du cytochrome P450 chez les différentes souches.

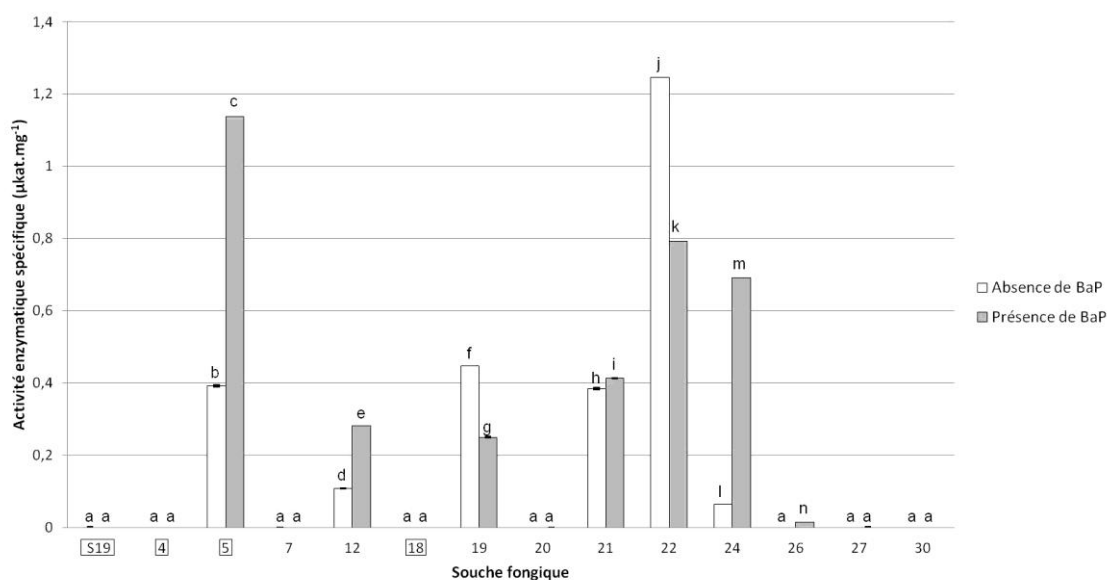


Figure II 14: Activités spécifiques époxydase du cytochrome P450 dans les lysats cellulaires après 9 jours de culture en présence ou en absence de BaP (encadrées = souches dont le taux de dégradation moyen du BaP dépasse 30%)

L'activité de détoxification du cytochrome P450 est largement décrite comme principale responsable de la dégradation des HAP chez les champignons non lignolytiques (Cerniglia, 1992 ; Juhasz et Naidu, 2000 a). Cette activité n'apparaît cependant que chez 6 souches sur 15 testées dans les conditions expérimentales appliquées. En outre, la plupart des souches présentant des activités importantes possèdent les capacités de dégradation du BaP les plus basses (souches 19, 21, 22 et 24). Ces résultats sont à mettre en lien avec l'observation que l'implication du cytochrome P450 dans la dégradation des HAP a été établie de manière indirecte dans la plupart des études (Van den Brink *et al.*, 1998). Etant donné la difficulté de purification des cytochromes P450, ces études se basent en effet sur l'utilisation d'inhibiteurs, la dépendance au NADPH, l'incorporation de ^{18}O ou l'identification des

métabolites de dégradation des HAP. La souche 5 fait exception puisqu'elle présente une activité époxydase importante et appartient aux souches les plus efficaces dans la dégradation du BaP. Cette activité est augmentée de façon très importante en présence de BaP. La souche 5 pourrait ainsi posséder une enzyme de la famille des cytochromes P450 efficace vis-à-vis du BaP et inductible par la présence de cette molécule. Des études structurales de cette superfamille d'enzymes chez le Basidiomycète lignolytique *Phanerochaete chrysosporium* ont en effet déjà souligné leurs capacités de dégradation d'une grande variété de xénobiotiques (Hlavica, 2013). En particulier, des cytochromes P450 de *Phanerochaete chrysosporium* ont été caractérisés du point de vue génétique et fonctionnel pour leur efficacité d'oxydation de HAP de différentes masses molaires dont le BaP et leur expression inductible par ces molécules (Syed *et al.*, 2010).

2.2. Enzymes de détoxification du stress oxydant

2.2.1. Corrélation entre capacités de dégradation du BaP et activités enzymatiques

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites par les cellules fongiques sont décrites comme capables d'initier le processus de dégradation des HAP via des réactions chimiques de type Fenton (Rafin *et al.*, 2006). L'activité des enzymes responsables de la détoxification des ERO (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, glucose-6-phosphate déshydrogénase) est donc étudiée afin de déterminer si un lien existe entre les processus de stress oxydatif et la dégradation du BaP chez les souches considérées. Les ACP présentées par la figure II 15 reprennent les résultats d'analyse de ces activités enzymatiques en présence ou en absence de BaP.

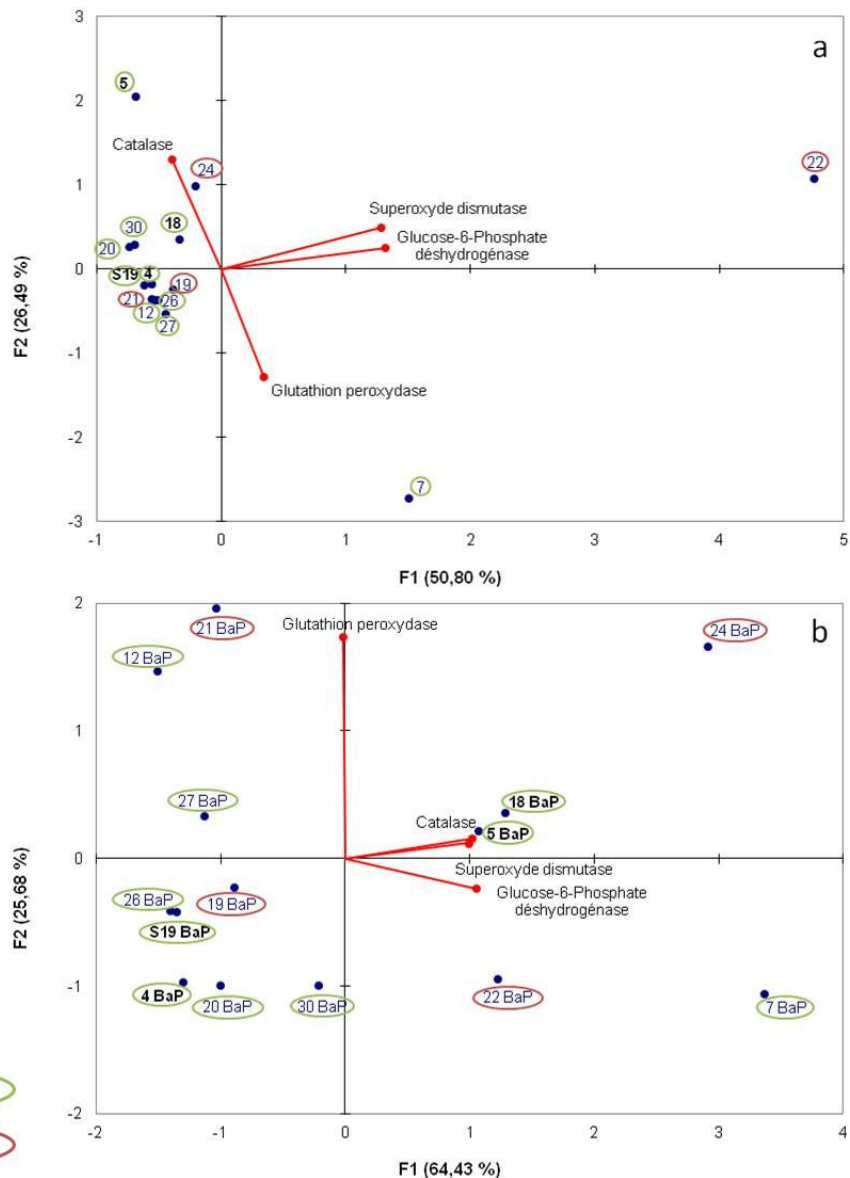


Figure II 15: Analyse en composantes principales sur matrice de coefficient de Pearson des activités enzymatiques du stress oxydant chez les souches en absence (a) et en présence (b) de 500µg de BaP sur 9 jours (en noire = souches dont le taux de dégradation moyen du BaP dépasse 30%)

Contrairement à l'ACP de la figure II 11 qui représente les activités d'enzymes directement impliquées dans la dégradation des HAP, les ACP de la figure II 15 concernent des réactions enzymatiques de natures très diverses impliquées dans la détoxification du stress oxydant. Ces ACP sont donc réalisées sur une matrice de coefficient de Pearson afin de réaliser une mise à l'échelle entre les différents types d'activité enzymatique spécifique.

En absence de BaP (figure II 15 a), les activités superoxyde dismutase (SOD) pour la souche 22 (*Cladosporium bruhnei*) et catalase pour les souches 5 et 24 (respectivement *Cladosporium cladosporioides* et *Cladosporium sp.*) apparaissent déjà importantes indiquant une détoxification constitutive des ERO supérieure aux autres souches. Il est intéressant de

souligner que cette particularité concerne trois souches du même genre et que deux d'entre elles soient faiblement efficaces dans la dégradation du BaP (22 et 24). La souche 7 (*Penicillium roqueforti*) est la seule à subir l'influence principale de l'activité glutathion peroxydase en absence de BaP. La majorité des souches présente des activités des enzymes du stress oxydant très faibles en absence de BaP.

L'ajout de BaP (figure II 15 b) entraîne un éclatement de la distribution des souches. Concernant les souches dépassant 10% de dégradation du BaP en moyenne, la souche 7 passe d'une influence prédominante de la glutathion peroxydase (GPOX) en absence de BaP à celle de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) en présence de BaP, ce qui souligne une interaction de cette molécule avec les niveaux d'activité des enzymes du stress oxydant. Deux souches présentant un taux de dégradation moyen du BaP supérieur à 30% (5 et 18) se retrouvent groupées par leurs activités catalase et SOD de niveaux semblables. Ces résultats sont en accord avec la description des activités SOD, catalase et G6PD comme prédominantes chez les champignons filamenteux en cas de stress oxydant (Angelova *et al.*, 2005 ; Krumova *et al.*, 2009). Les similarités de niveaux d'activité enzymatique chez des souches présentant des efficacités de dégradation du BaP semblables pourraient refléter un lien entre stress oxydant et dégradation du BaP comme proposé par Rafin *et al.* (2006). Les deux autres souches les plus efficaces dans la dégradation du BaP (S19 et 4) se regroupent également avec la souche 26 (21,5% de dégradation) du fait d'un ensemble d'activités enzymatiques du stress oxydant faibles qui pourrait refléter une résistance de ces souches vis-à-vis de la toxicité du BaP. Les souches peu efficaces dans la dégradation du BaP présentent des activités particulièrement importantes concernant certaines enzymes du stress oxydant. En effet la souche 21 (*Bionectria ochroleuca*) est corrélée à l'activité GPOX, la souche 22 à celle de la G6PD et la souche 24 à celles de la GPOX et de la SOD. Ces activités pourraient correspondre à une réponse liée à l'effet toxique du BaP sur ces souches.

2.2.1. Activités enzymatiques superoxyde dismutase

La figure II 16 permet d'étudier plus précisément les activités mesurées concernant la superoxyde dismutase.

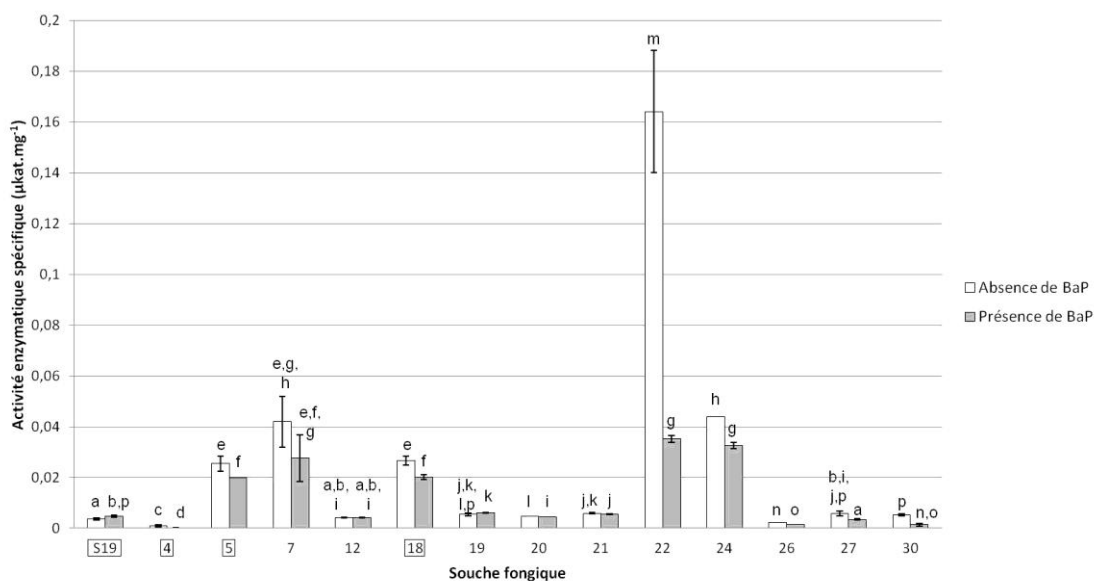


Figure II 16: Activités spécifiques de type superoxyde dismutase au sein des lysats cellulaires des souches après 9 jours de culture en présence ou en absence de BaP (encadrées = souches dont le taux de dégradation moyen du BaP dépasse 30%)

La majorité des souches présentent des niveaux d'activités faibles concernant la SOD que ce soit en présence ou en absence de BaP. Chez les souches présentant une activité plus élevée (5, 7, 18, 22 et 24), la présence de BaP apparaît diminuer ces activités. Une explication à ce phénomène pourrait être une consommation des radicaux superoxydes par une réaction chimique d'oxydation du BaP. Cette hypothèse est intéressante concernant les souches 5 et 18 qui appartiennent aux souches les plus efficaces dans la dégradation du BaP (42,6% et 31,45% respectivement). Cependant ce phénomène est également observable pour des souches très peu efficaces dans la dégradation du BaP (22 et 24). Les voies de dégradation du BaP doivent donc impliquer la combinaison complexe de plusieurs mécanismes.

2.2.2. Activités glucose-6-phosphate déshydrogénase et glutathion peroxydase

La glucose-6-phosphate déshydrogénase présente des activités faibles chez la majorité des souches, c'est pourquoi la figure n'est pas montrée. Certaines informations restent cependant à retenir: les souches 7, 22 et 24 montrent les niveaux d'activité enzymatique les plus élevés et les souches 5 et 18 présentent une augmentation similaire de leurs activités en présence du BaP. Dans le cadre du stress oxydant, la G6PD génère le NADPH nécessaire à la glutathion réductase pour réduire le glutathion utilisé par la glutathion peroxydase. Ainsi l'étude de l'activité de cette dernière enzyme apparaît plus informative (figure II 17).

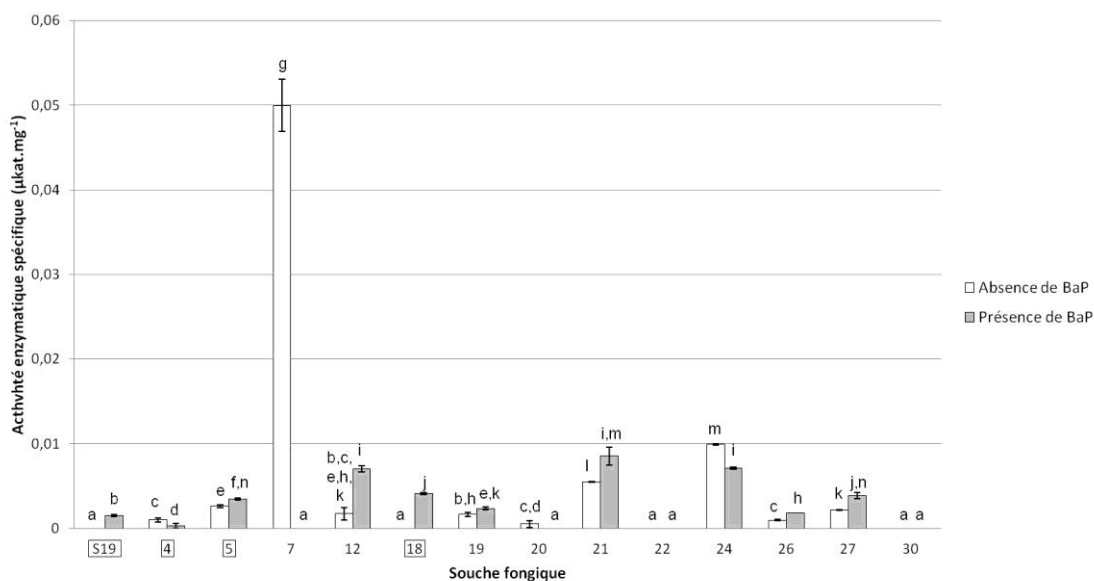


Figure II 17: Activités spécifiques de type glutathion peroxydase au sein des lysats cellulaires des souches après 9 jours de culture en présence ou en absence de BaP (encadrées = souches dont le taux de dégradation moyen du BaP dépasse 30%)

L'activité GPOX est faible ou nulle pour les souches 4, 20, 22 et 30, ces résultats restent inchangés en présence de BaP. D'autres souches présentent un niveau d'activité faiblement stimulé par la présence de BaP (S19, 5, 12, 18, 19, 21, 26 et 27). Cependant ce phénomène concerne aussi bien des souches efficaces dans la dégradation du BaP (S19, 5 et 18) que des souches peu efficaces (19 et 21). Pour les souches 7 et 24 qui présentent les activités spécifiques les plus élevées en absence de BaP (0,05 et 0,01 $\mu\text{kat.mg}^{-1}$ respectivement), cette activité diminue ou disparaît en présence de BaP. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour la G6PD soulignant le lien entre ces deux enzymes lors du processus de stress oxydant. En effet des niveaux d'activités importants chez les mêmes souches (7 et 24) et une augmentation des niveaux d'activités des souches 5 et 18 sont retrouvés pour les deux enzymes.

2.2.3. Activités enzymatiques catalase

La catalase est la principale responsable de la dismutation de l'eau oxygénée et possède ainsi une action complémentaire à l'activité de la GPOX qui détoxifie le peroxyde d'hydrogène dans des compartiments cellulaires différents (les péroxysomes pour la catalase et les mitochondries ou le cytoplasme pour la GPOX). Dans le but de voir si l'effet stimulateur du BaP sur l'activité GPOX de la majorité des souches est retrouvé pour la catalase, la figure II 18 propose une représentation graphique mettant en relation les niveaux d'activité catalase chez les différentes souches en présence et absence de BaP.

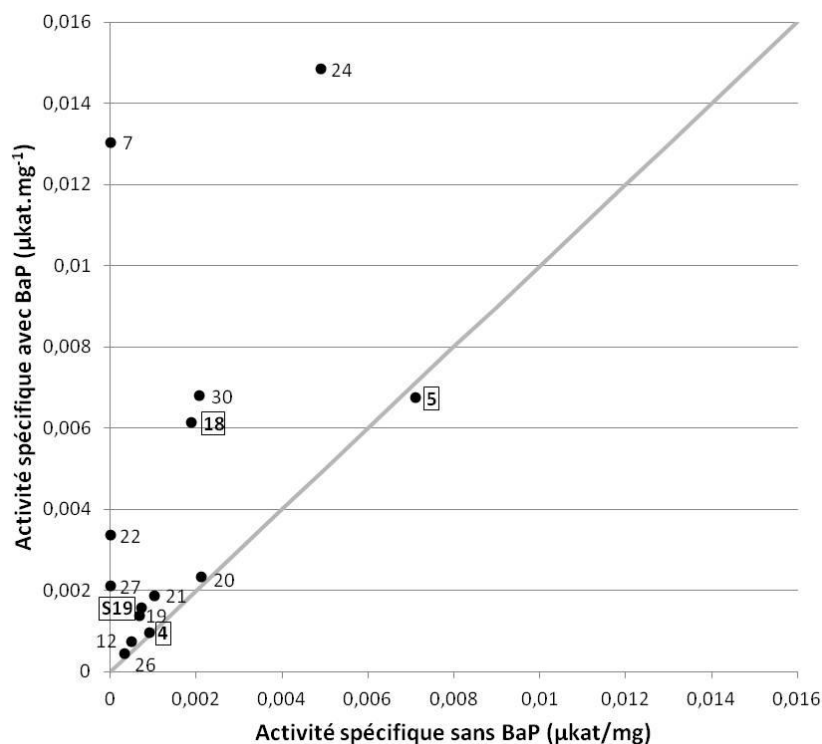


Figure II 18: Mise en relation des activités spécifiques moyennes de type catalase en présence et en absence de BaP dans les lysats cellulaires après 9 jours d'incubation (encadrées = souches dont le taux de dégradation moyen du BaP dépasse 30%)

Cette représentation des données permet d'observer que la très grande majorité des souches vient se positionner au dessus de la diagonale. Cette ligne matérialise un effet nul de l'ajout de BaP. La présence de BaP apparaît donc bien entraîner une augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène chez la quasi-totalité des souches testées. La relation entre niveau d'activité et capacité de dégradation du BaP est cependant de nouveau complexe à établir. En effet si trois souches sur quatre peu efficaces dans la dégradation du BaP présentent des activités catalases faibles (19, 21 et 22), les souches les plus efficaces (>30% de dégradation du BaP) se scindent en deux groupes. De fait, les souches S19 et 4 présentent une activité catalase faible tandis que les souches 5 et 18 présentent un niveau d'activité catalase plus élevé. Ce niveau d'activité regroupe les souches 5 et 18 avec la souche 30 qui possède un taux de dégradation du BaP significatif (17,6%). La similarité d'activité catalase observée pour les souches 5 et 18 est retrouvée pour toutes les enzymes du stress oxydatif étudiées et pourrait être en lien avec leur capacité de dégradation du BaP (figure II 15). Les souches 7 et 24 possèdent les activités catalase les plus importantes, ce qui était également le cas pour la GPOX. La présence des activités de détoxification du peroxyde d'hydrogène les plus élevées chez ces souches présentant des taux de dégradation du BaP non significatifs

pourrait révéler un lien entre la concentration en peroxyde d'hydrogène et la dégradation de cet HAP.

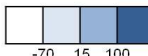
2.3. Synthèse des résultats de mesures d'activités enzymatiques

Les données des analyses enzymatiques représentant une quantité importante d'informations, il nous semble nécessaire de les résumer afin de confronter les résultats obtenus pour les deux familles d'activités étudiées : les enzymes impliquées dans la dégradation des HAP (Mn POX, Ln POX, laccase et cytochrome P450) et celles du stress oxydant (SOD, GPOX, G6PD et Catalase). Le tableau II 4 synthétise ainsi sous forme de scores les résultats de l'ensemble des activités étudiées pour les souches les plus efficaces (> 30%) et les moins efficaces (< 10%) dans la dégradation du BaP. Ces scores sont utilisés afin de pouvoir comparer les activités des différentes enzymes entre elles.

Le calcul des scores est réalisé de la manière suivante: les moyennes des activités enzymatiques chez les 14 souches étudiées sont calculées pour chaque enzyme. La différence entre l'activité enzymatique de chaque souche et l'activité enzymatique moyenne correspondante est calculée. Cette différence est convertie en pourcentage par rapport à l'activité enzymatique moyenne. Ce calcul est réalisé séparément pour les cultures témoins et les cultures mises en présence du BaP. L'intensité de coloration des cases classe les moyennes des scores obtenus en absence et en présence de BaP pour une activité enzymatique chez une même souche: -100 à -70 = activité nulle ou très faible, -69 à 15 = activité faible, 16-100 = activité moyenne, plus de 100 = activité forte.

Tableau II 4: Représentation des activités enzymatiques les plus informatives sous forme de scores pour les souches les plus efficaces et les moins efficaces dans la dégradation du BaP

		Enzymes de dégradation des HAP								Enzymes du stress oxydant							
		Mn POX		Ln POX		Laccase		P450		SOD		GPOX		G6PD		Catalase	
		Témoin	BaP	Témoin	BaP	Témoin	BaP	Témoin	BaP	Témoin	BaP	Témoin	BaP	Témoin	BaP	Témoin	BaP
Dégradation BaP > 30 %	S19	-19	49	5	188	-100	-100	-100	-100	-85	-60	-100	-47	-100	-100	-55	-65
	4	186	-32	503	16	-100	-100	-100	-100	-96	-100	-82	-90	-63	-47	-43	-78
	5	-47	19	-61	122	-100	-100	108	345	5	67	-52	21	-28	62	348	51
	18	-27	158	-100	-99	-100	-100	-100	-100	9	69	-100	43	-91	106	18	38
Dégradation BaP < 10 %	19	-54	-68	-41	-37	-100	-54	137	-2	-78	-50	-70	-18	-43	-33	-57	-69
	21	17	18	4	18	-100	-100	103	61	-76	-53	1	198	-100	-58	-36	-58
	22	52	178	91	-32	-100	-100	560	210	576	196	-100	-100	813	41	-100	-25
	24	-48	12	-77	-1	-100	-100	-66	170	81	173	83	149	-81	93	208	233

Intensités de coloration correspondant aux valeurs moyennes entre témoins et traitements:  -70 15 100

Les scores présentés par le tableau II 4 montrent la variabilité des réponses entre les différentes souches pour une même activité enzymatique. De fait, le BaP peut avoir un effet stimulateur ou inhibiteur sur une même activité enzymatique selon la souche. Cette variabilité peut s'expliquer par une diversité des propriétés des enzymes fongiques entre espèces et une richesse des voies de dégradation du BaP chez les champignons. Elle peut néanmoins également provenir des conditions de mesure choisies. En effet les activités enzymatiques de cette étude ont été mesurées après le même temps d'incubation que les expériences de biodégradation du BaP (9 jours). Cependant si les taux de dégradation obtenus lors de ces expériences correspondent à la quantité cumulée de BaP dégradé pendant 9 jours, les activités enzymatiques impliquées dans la dégradation peuvent s'exprimer après des délais d'incubation inférieurs. Un suivi cinétique des activités enzymatiques serait ainsi plus approprié. Néanmoins, il a été choisi dans cette étude de privilégier une approche de criblage d'un grand nombre d'activités enzymatiques pour leur implication dans la dégradation du BaP. Un suivi cinétique aurait été trop complexe à réaliser d'un point de vue matériel et temporel pour un tel panel d'enzymes.

Les intensités de coloration du tableau II 4 selon les moyennes des activités enzymatiques en présence et en absence de BaP permettent une meilleure visualisation des différences entre souches. Ces moyennes permettent de prendre en considération l'influence du BaP sur les activités enzymatiques sans tenir compte de sa nature stimulatrice ou inhibitrice. L'étude des résultats de manière globale amène à l'observation que les souches efficaces dans la dégradation du BaP (> 30% de dégradation), positionnées dans la partie supérieure du tableau, présentent des activités Mn POX et Ln POX légèrement supérieures aux souches peu efficaces (< 10% de dégradation) de la partie inférieure. Cette observation est en accord avec l'ACP réalisée sur l'ensemble des souches étudiées (figure II 11). Il est intéressant d'obtenir un tel résultat pour des souches saprotrophes, car ces enzymes ont été jusqu'à présent décrites presque exclusivement chez les Basidiomycètes lignolytiques (Passardi *et al.*, 2007). Gramss *et al.* (1999) ont également obtenu une bonne corrélation des capacités de dégradation des HAP avec les activités peroxydases chez 58 souches comprenant des champignons lignolytiques, ectomycorrhiziens et saprotrophes. Mais à la différence de notre étude, les champignons saprotrophes n'appartenaient qu'à l'embranchement des Basidiomycètes. Des analyses par Southern blot ont pourtant déjà indiqué l'existence d'un système enzymatique de dégradation de la lignine comparable à celui des champignons lignolytiques chez des Ascomycètes saprotrophes (Mönkemann *et al.*, 1997). De façon

intéressante les espèces *Penicillium canescens* (souche 4) et *Cladosporium cladosporioides* (souche 5) sont décrites pour être parfois isolées à partir du bois (chapitre I) et pourraient ainsi présenter une machinerie enzymatique adaptée à la dégradation de la lignine. Il a par ailleurs été montré qu'une souche de la même espèce que la souche S19 (*Fusarium solani*) est capable de dégrader la lignine et présente des activités Ln-POX (Lozovaya *et al.*, 2006) de façon concordante à notre étude.

L'activité de détoxification du cytochrome P450 semble quant à elle concerner très majoritairement les souches peu efficaces dans la dégradation du BaP. Ce résultat est également surprenant du fait du rôle prédominant donné au cytochrome P450 dans la dégradation des HAP chez les champignons non lignolytiques (Cerniglia, 1992 ; Juhasz et Naidu, 2000 a). Seule la souche 5 (*Cladosporium cladosporioides*) qui présente l'un des meilleurs taux moyen de dégradation du BaP présente une activité importante de type époxydase qui pourrait donc être adaptée à la dégradation de cet HAP.

Les enzymes du stress oxydant apparaissent générer des activités plus importantes chez les souches peu efficaces dans la dégradation du BaP. Le BaP entraînerait ainsi un stress oxydant chez ces souches qui le dégraderaient de manière peu efficiente par le mécanisme de détoxification du cytochrome P450. Un niveau assez élevé est également observé chez la souche 5 (*Cladosporium cladosporioides*), ce qui souligne la corrélation entre activité du cytochrome P450 et enzymes du stress oxydant. Une explication à ce phénomène pourrait être une interférence de l'activité peroxydase des cytochromes P450 avec la mesure des activités des enzymes du stress oxydant. L'existence de l'activité peroxydase chez les cytochromes P450 est en effet depuis longtemps connue et documentée (Hrycay et O'Brien, 1971 et 1972 ; Dunford et Stillman, 1976 ; White et Coon, 1980 ; Marnett *et al.*, 1986). Cette hypothèse expliquerait en particulier l'activité catalase de la souche 5 (*Cladosporium cladosporioides*) qui est élevée pour une souche efficace dans la dégradation du BaP, mais corrélée à l'importante activité époxydase du cytochrome P450 de cette souche. Parmi les souches efficaces, il est également intéressant de souligner les similarités entre les activités des enzymes du stress oxydant des souches 5 (*Cladosporium cladosporioides*) et 18 (*Talaromyces helicus*). Ces corrélations pourraient refléter un lien complexe et encore peu compris entre ERO et dégradation du BaP.

3. Expériences de dégradation des HAP en sols historiquement contaminés

Dans une démarche d'élaboration d'un protocole de bioremédiation en conditions réelles, la caractérisation des capacités métaboliques des souches isolées nous conduit à envisager des phases d'étude en échantillons de sols pollués historiquement. Ces études ont été réalisées en microcosmes de 120 g de sol (équivalent masse sèche) au laboratoire. Les approches choisies appartiennent à la bioaugmentation et à la biostimulation. Pour rappel, la biostimulation correspond à l'utilisation d'amendements chimiques, de nutriments et d'autres composés qui affectent les réactions métaboliques, tandis que la bioaugmentation consiste en l'introduction de microorganismes compétents dans la biodégradation des contaminants ciblés (US EPA, 2006).

3.1. Choix des paramètres expérimentaux

Les sols B2 et C6 sont choisis du fait de leurs origines et textures différentes. Le sol B2 provient du site de Dunkerque et le sol C6 est originaire du site de l'ancienne usine à gaz. La texture du sol B2 présente une plus grande proportion de sable que le sol C6 à prédominance limono-argileuse (respectivement 311 g.kg⁻¹ et 252 g.kg⁻¹ en sables totaux). Ces sols présentent des teneurs en HAP totaux du même ordre (≈ 300 mg.kg⁻¹) et des densités fongiques importantes soulignées lors des phases d'isolement (chapitre I). Les profils de contamination en HAP des deux sols sont similaires pour les HAP de 4 cycles, mais le sol C6 est légèrement plus riche en HAP lourds de 5-6 cycles (2-3 cycles: 33,6% (B2) et 25,3% (C6), 4 cycles: 40,2% (B2) et 39,2% (C6), 5-6 cycles: 26,2% (B2) et 35,5% (C6)).

Les souches choisies pour ces expériences sont la souche S19 (*Fusarium solani*), notre modèle d'étude, et les souches 5 (*Cladosporium cladosporioides*) et 18 (*Talaromyces helicus*). Le choix des souches 5 et 18 s'explique de par leur efficacité de dégradation du BaP (42,6% et 31,45% respectivement) en milieu minéral, la similarité de certaines de leurs activités enzymatiques et leurs sols d'origine. La souche 5 est isolée du sol A1 et constitue ainsi une souche allochtone pour les deux sols utilisés dans le cadre de ces essais, tandis que la souche 18 est autochtone du sol C6.

L'inoculation de la souche 18 dans son sol d'origine est également l'occasion de tester une démarche de biostimulation dans trois conditions expérimentales différentes. Pour le premier traitement, une solution d'ammonium et de phosphate de sodium permet d'abaisser le ratio C/N du sol (≈ 49 , chapitre I) à une valeur de 17. Cette valeur est choisie car elle se

trouve dans la gamme des ratios théoriquement favorables à la biodégradation des molécules organiques au sein des sols (chapitre I ; Golueke, 1981 ; Duchaufour, 1988 ; Raj et Antil, 2011). Un ratio N/P de 15 indicateur d'un équilibre entre ces éléments chimiques dans les tissus végétaux (Koerselmann et Meulemann, 1996) dont se nourrissent les champignons saprotrophes est établi au sein de la solution. Le second traitement couple l'ajout d'une source de carbone facilement assimilable à l'enrichissement en azote et phosphate. Pour cela, 10 g.L⁻¹ de glucose sont ajoutés à la solution de nitrate ammonium et de phosphate de sodium. Concernant le troisième traitement, l'aération du sol est réalisée par homogénéisation de l'échantillon à la spatule une fois par semaine.

Les sols ne sont pas stérilisés afin de minimiser les modifications des propriétés physico-chimiques liées à ce type de protocole et afin d'étudier l'effet de l'inoculation d'une souche au sein des microflore endogènes sur la dégradation des HAP. Bien qu'efficaces pour l'élimination des microorganismes, des études montrent en effet que les techniques classiques de stérilisation entraînent des modifications importantes des propriétés du sol (Walker et Thompson, 1949 ; Wolf *et al.*, 1989) et notamment du partitionnement chimique des molécules (Lotrario *et al.*, 1995). Or les phénomènes d'adsorption aux particules du sol sont particulièrement importants pour l'étude de la dégradation de molécules comme les HAP dont la faible biodisponibilité constitue l'un des principaux facteurs limitant la biodégradation. L'effet de techniques de stérilisation des sols sur la séquestration liée à l'âge de la contamination et sur la biodisponibilité d'un HAP a d'ailleurs déjà été décrit (Slizovskiy et Kelsey, 2010). D'autre part, la conservation de la microflore endogène dans ces expériences de bioaugmentation permet de tenir compte des interactions avec les souches inoculées sur l'efficacité de décontamination. En effet la microflore bactérienne du sol a déjà été décrite pour avoir un effet synergique sur la dégradation de certains HAP, mais antagoniste pour la dégradation des HAP totaux par des champignons lignolytiques (Borràs *et al.*, 2010). L'interaction avec les microflore endogènes des sols contaminés est une réalité des traitements de bioremédiation *in situ* ou *ex situ*. Afin de se rapprocher au mieux de cette réalité, l'effet de la microflore endogène est considéré comme une propriété intrinsèque des échantillons de sol utilisés dans le cadre de ces expériences. Ainsi les résultats obtenus ne sont pas le reflet de la dégradation entraînée par la souche inoculée seule, mais de ses interactions avec les microorganismes naturellement présents dans les échantillons de sol étudiés.

3.2. Expériences de bioaugmentation

La figure II 19 présente les taux de dégradation obtenus pour le sol B2 après bioaugmentation avec les trois souches sélectionnées.

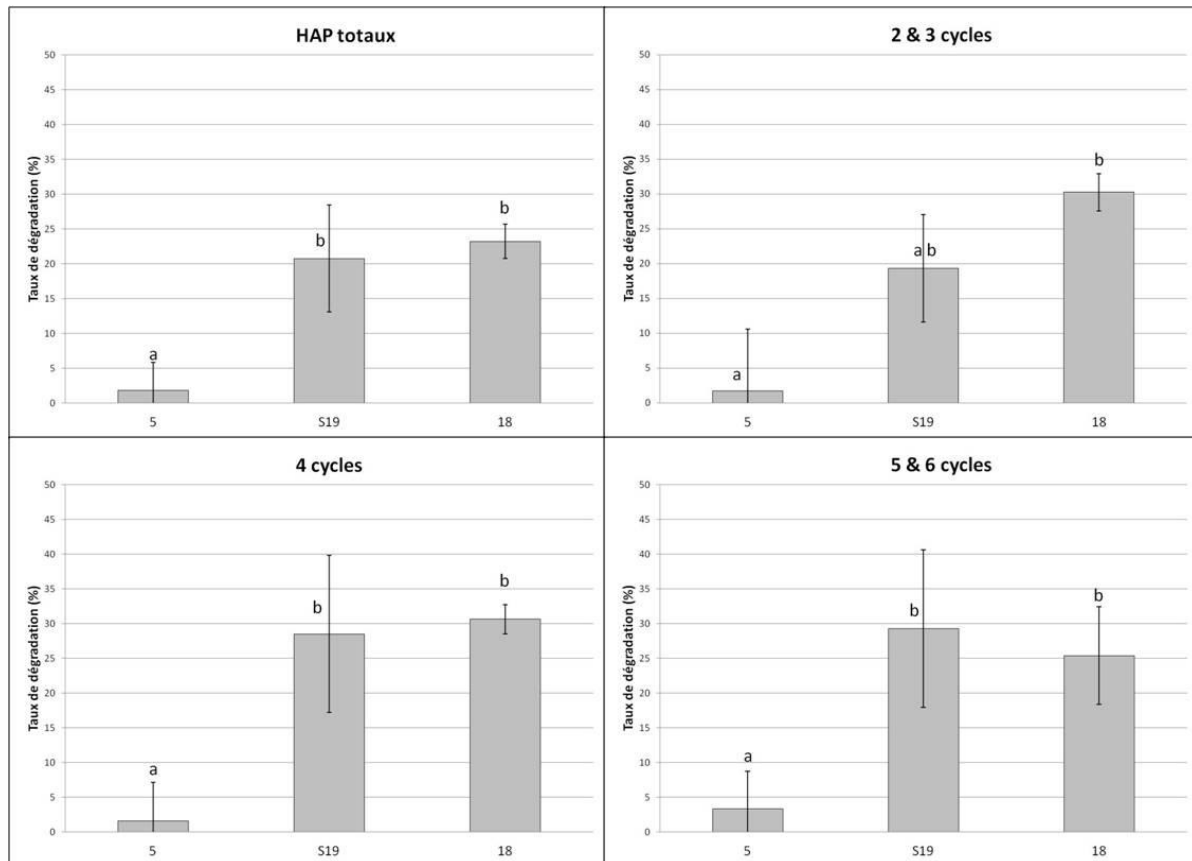


Figure II 19: Pourcentages de dégradation des HAP totaux et par classe d'HAP 30 jours après inoculation des souches 5, S19 et 18 en sol B2 par rapport aux témoins

Les taux de dégradation en HAP totaux obtenus 30 jours après inoculation dans les traitements des souches S19 et 18 atteignent respectivement 20,8% et 23,2%. Ces taux sont statistiquement supérieurs à ceux obtenus dans les traitements en présence de la souche 5 qui ne permet pas d'obtenir de dégradation significative par rapport aux témoins. Si les HAP sont séparés par classes selon le nombre de cycles, il est intéressant de noter que les taux moyens de dégradation des traitements inoculés par la souche S19 semblent augmenter avec la masse molaire des HAP. En effet si la dégradation moyenne obtenue en présence de la souche S19 n'est pas statistiquement différente de celle obtenue en présence de la souche 5 pour les HAP de 2 et 3 cycles, elle le devient pour les HAP de 4, 5 et 6 cycles. Lors d'une expérience similaire d'inoculation de souches fongiques saprotrophes en sol industriel, Potin *et al.* (2004 a) ont également observé une dégradation plus importante des HAP de hautes masses molaires. A l'opposé de S19, les taux de dégradation obtenus suite à l'inoculation de la

souche 18 ne varient pas selon la masse molaire des HAP avec 30% de dégradation des HAP de 2, 3 et 4 cycles et une diminution non significative à 25% pour les HAP de 5 et 6 cycles. La polyvalence de la dégradation des différentes classes de HAP suite à l'inoculation de la souche 18 (*Talaromyces helicus*) souligne son intérêt pour une bioremédiation homogène des profils de contamination en HAP. De plus, ses capacités de résistance aux éléments traces métalliques (Romero *et al.*, 2006) en font une souche potentiellement avantageuse pour la bioremédiation de sols aux contaminations multiples. Ce résultat est d'autant plus intéressant que c'est la première étude à notre connaissance à souligner les possibilités de *Talaromyces helicus* pour la bioremédiation des HAP dans les sols.

L'étude de Potin *et al.* (2004 a) a montré que l'inoculation de mycélium aboutit à de meilleurs taux de dégradation que l'utilisation de spores. Cette observation est en adéquation avec les bons résultats de dégradation des HAP obtenus dans cette expérience d'inoculation de mycélium installé sur un matériel porteur. Cette efficacité de l'inoculation de mycélium sur des matériaux porteurs pour la dégradation de pollutions historiques en HAP a déjà été observée pour des champignons lignolytiques (Covino *et al.*, 2010 a, b et c). Mais à la différence de notre étude utilisant des grains d'argile, les matériaux porteurs lignocellulosiques des expériences de Covino *et al.* (2010 a, b et c) constituent également des substrats pour les champignons lignolytiques inoculés. Ces matériaux porteurs ont ainsi pour objectif d'offrir un microenvironnement favorable au développement de ces souches se développant de manière naturelle dans le bois en décomposition. En effet il est décrit que les conditions physicochimiques du sol et la compétition avec les microorganismes endogènes ont un effet antagoniste sur l'efficacité de dégradation des HAP par les champignons lignolytiques dans les sols (Singleton, 2001). De façon intéressante, l'utilisation dans notre étude de champignons saprotrophes adaptés à la vie dans les sols semble permettre une dégradation efficace des HAP sans ajout de sources nutritionnelles favorisant leur installation. Un suivi des populations fongiques par des techniques de PCR sur les séquences ITS est cependant requis et reste à réaliser afin de vérifier l'installation des souches inoculées. Le même type de matériel porteur que celui de nos expériences a déjà été utilisé avec succès pour l'inoculation d'une communauté microbienne dans des essais de bioremédiation du pesticide isoproturon sur un site expérimental (Grundmann *et al.*, 2007). L'inoculation de microorganismes installés sur ce matériel porteur apparaît ainsi être une approche viable pour des expériences à plus grande échelle.

La figure II 20 présente les résultats de dégradation obtenus par bioaugmentation dans le sol C6.

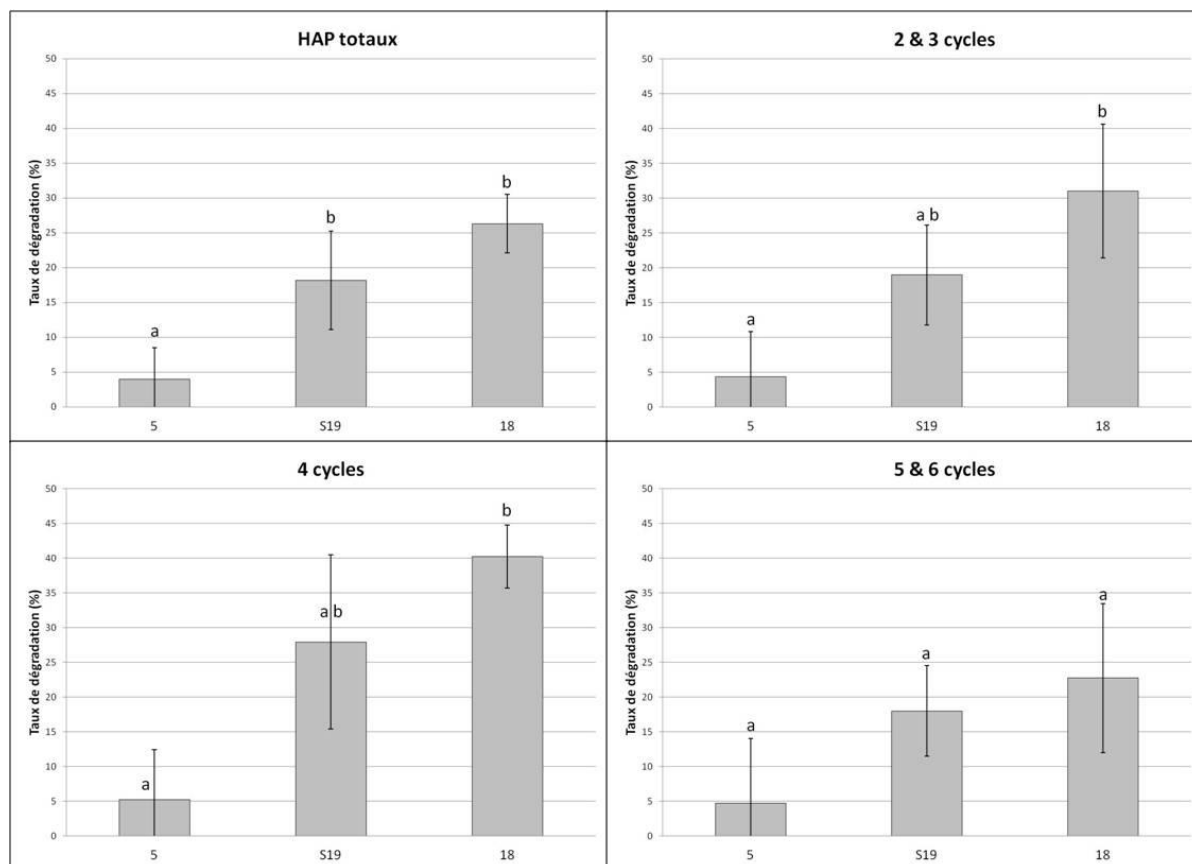


Figure II 20: Pourcentages de dégradation des HAP totaux et par classe d'HAP 30 jours après inoculation des souches 5, S19 et 18 en sol C6 par rapport aux témoins

Dans les sols ensemencés avec les souches S19 et 18, les taux de dégradation moyens (18,17% et 26,3%) sont significativement différents du résultat obtenu en présence de la souche 5 qui ne se distingue pas statistiquement des témoins. Une cause possible du faible impact de l'inoculation de la souche 5 sur la dégradation des HAP pourrait être que la souche 5 ne soit pas adaptée à vivre dans les deux sols utilisés dans ces expérimentations, car étant allochtone. Une autre explication pourrait venir de son mode d'isolement par suspension/dilution qui ne prouve pas sa présence à un état métaboliquement actif dans son sol contaminé d'origine, contrairement à la souche 18 (chapitre I). La souche 5 (*Cladosporium cladosporioides*) pourrait ainsi présenter un potentiel de dégradation des HAP (§1.2 des Résultats et Discussion) inhibé par les conditions physico-chimiques du sol ou par les contaminations multiples des échantillons étudiés. L'inoculation d'une autre souche de cette espèce lors d'une autre étude de bioaugmentation effectuée sur des sols artificiellement contaminés (Colombo *et al.*, 1996) a précédemment souligné sa faible capacité de

colonisation d'un sol contenant des hydrocarbures. La faible vitesse de croissance des champignons du genre *Cladosporium* pourrait impliquer une faible compétitivité en sol qui perturberait leurs capacités de dégradation des HAP.

Les résultats obtenus pour le sol C6 sont extrêmement similaires à ceux du sol B2, ce qui viendrait soutenir la transférabilité de la méthode dans différents types de sol et le faible impact de l'origine de la souche. Cette hypothèse reste cependant à vérifier sur une plus grande variété d'échantillons. En effet il est à souligner que les deux sols utilisés présentent un pH alcalin (tableau II 5, chapitre I) et ce paramètre pédologique est déterminant dans la composition des communautés microbiennes. Les variations d'autres paramètres physico-chimiques entre les deux sols peuvent cependant avoir entraîné une différence dans les classes de HAP dégradés. En effet, les pourcentages de dégradation les plus élevés sont obtenus pour les HAP de 4 cycles concernant les échantillons de sol C6 inoculés avec les souches S19 et 18. Cette efficacité moindre de dégradation concernant les HAP de 5 et 6 cycles n'était pas observée pour le sol B2, ce qui pourrait indiquer une influence de la matrice du sol sur la biodisponibilité et la dégradation des HAP les plus lourds. Le sol B2 présente de fait une capacité d'échange cationique et une teneur hydrique optimale inférieure au sol C6, ainsi que des teneurs en carbone organique et en matières organiques supérieures (tableau II 5, chapitre I). Or l'ensemble de ces variations est connu pour favoriser de plus grandes interactions hydrophobes et pourrait ainsi expliquer une séquestration préférentielle des HAP de hautes masses molaires dans le sol B2 par rapport au sol C6.

Tableau II 5: Comparaison des propriétés physico-chimiques des sols B2 et C6

Sol	Texture	Teneur hydrique optimale	C/N	C _{organique}	MO	CEC	pH
B2	Plus sableux	16 %	61,4	78,6 g.kg ⁻¹	136 g.kg ⁻¹	8,6 cmol.kg ⁻¹	9,83
C6	Plus limoneux	25,5 %	49	61,8 g.kg ⁻¹	107 g.kg ⁻¹	10,2 cmol.kg ⁻¹	8,93

Outre les propriétés physico-chimiques, la similarité des résultats obtenus pour les sols B2 et C6 semble indiquer que la différence de microflore endogène des deux sols considérés n'a pas affecté de façon majeure l'effet de l'inoculation sur la dégradation des HAP. Le fait que l'inoculation de la souche 5 allochtone du sol C6 ait un plus faible impact sur la dégradation des HAP que l'ajout de la souche 18 autochtone est modéré par les bons résultats du traitement par la souche S19 également allochtone. La bioaugmentation par des souches fongiques saprotrophes efficaces dans la dégradation des HAP semble ainsi une approche intéressante pour augmenter la dégradation des HAP dans différents types de sols. Un suivi des populations fongiques par des techniques de biologie moléculaire est cependant nécessaire

et sera effectué afin de compléter ces résultats par l'information de l'installation ou non des souches inoculées.

3.3. Couplage de la bioaugmentation et de la biostimulation d'une souche autochtone

Les résultats présentés par la figure II 21 concernent les expériences de biostimulation pour la souche 18 inoculée dans son sol d'origine (C6).

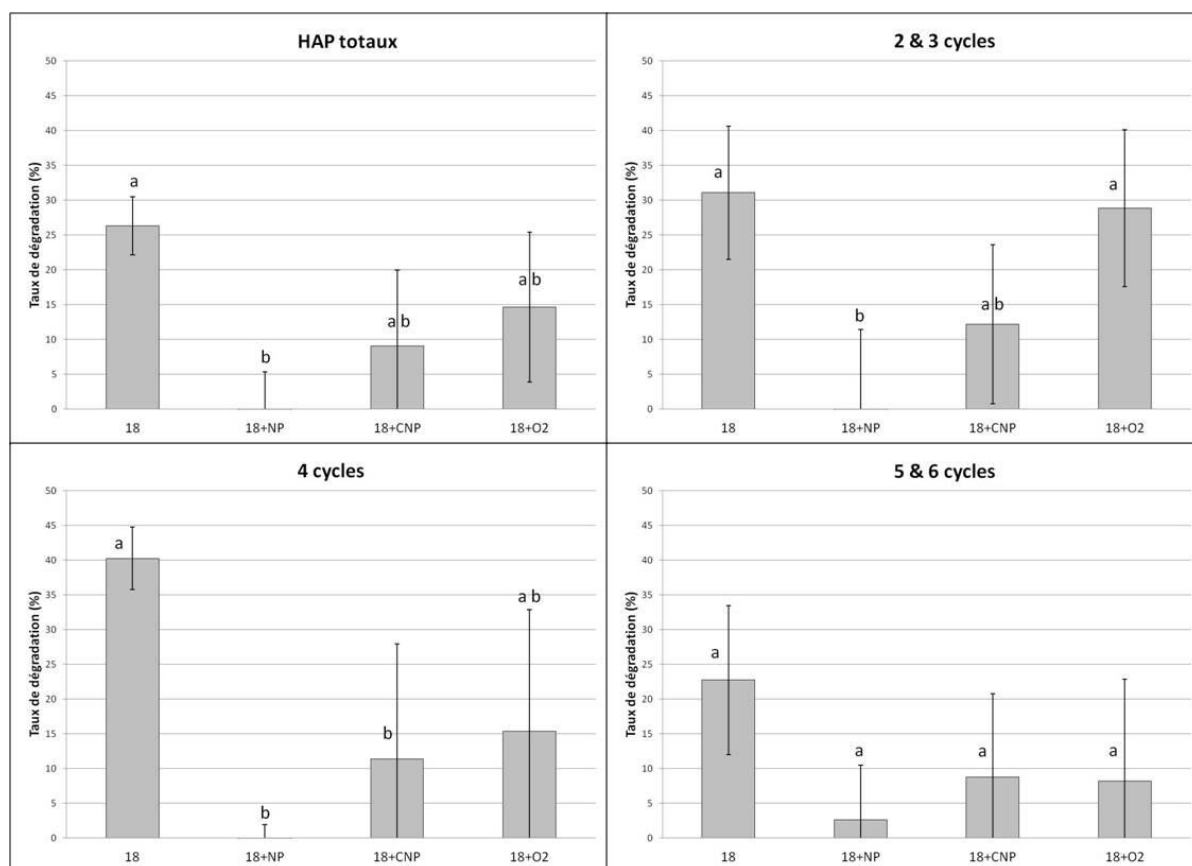


Figure II 21: Pourcentages de dégradation des HAP totaux et par classe d'HAP 30 jours après inoculation de 18 et biostimulation en sol C6 par rapport aux témoins

L'analyse des résultats de dégradation des HAP totaux montre que les différents traitements de biostimulation n'apportent aucune amélioration aux résultats obtenus avec la souche 18 dans le sol C6. Au contraire, l'ajout d'azote et phosphate entraîne une diminution significative du taux de dégradation par rapport à la bioaugmentation seule. Pour les trois types de biostimulation, les taux obtenus ne sont même plus significativement différents des témoins. Si les dégradations sont considérées par classe de HAP, l'inhibition de la dégradation par ajout d'azote et phosphate concerne toutes les masses molaires d'HAP et la combinaison avec une source de carbone n'entraîne pas de résultats significativement plus élevés. L'effet négatif de l'aération apparaît quant à lui augmenter avec la masse molaire des HAP. Cette

inhibition des bénéfices apportés par la bioaugmentation pourrait s'expliquer par la stimulation de microflores endogènes incapables de dégrader les HAP dans le cas de l'enrichissement en azote et phosphate, et capables de dégrader les HAP de faibles masses molaires dans le cas de l'aération. Une autre cause possible de l'effet différent de l'aération pourrait être une augmentation de la perte des HAP de faibles masses molaires par des phénomènes abiotiques de type volatilisation favorisés par l'homogénéisation régulière du sol. De telles pertes abiotiques ont en effet déjà été observées en bioréacteur à rotor contenant des boues contaminées en HAP (Park *et al.*, 1990 a ; Saponaro *et al.*, 2002). L'étude de ces phénomènes abiotiques montrent que la volatilisation peut être responsable de 30% des pertes en naphthalène dans des sols contaminés artificiellement et que des réactions abiotiques sont responsables d'une diminution de 2 à 20% des concentrations extraites en HAP de 2 et 3 cycles (Park *et al.*, 1990 b). La technique du "venting" repose d'ailleurs sur l'élimination physicochimique des composés les plus volatiles par aération artificielle des sols (US EPA, 1995 ; ADEME, 2013).

Notre expérience montre que les approches de biostimulation ne sont peut-être pas toujours souhaitables pour la remédiation des HAP en particulier de haute masse molaire. Certaines souches efficaces pour la dégradation des HAP telles que la souche 18 inoculée dans notre étude pourraient en effet être adaptées à des conditions précises du sol que l'ajout de nutriments peut perturber. L'ajout de nitrate à des sols est décrit comme n'ayant pas d'impact sur la composition des populations fongiques saprotrophes (Johansson, 2001). Cependant des approches de suivi des populations microbiennes par analyses génétiques restent à être réalisées dans notre étude afin de déterminer si l'effet inhibiteur de la biostimulation est dû au développement d'autres microorganismes ou à l'effet direct des nutriments sur la souche 18.

Ce type d'approche est pourtant rapporté efficace dans d'autres expériences. En particulier, Teng *et al.* (2010) ont décrit l'effet positif de l'ajout de sources de carbone, d'azote, et de l'aération par mélange du sol sur la dégradation du phénanthrène et du BaP d'une contamination historique par la microflore endogène. Toutefois, il est à noter que la plupart des autres démarches de biostimulation efficaces pour la dégradation des HAP en sol utilisent des substrats plus complexes tels que la bagasse de canne à sucre (Mancera-López *et al.*, 2008), la pailles et le son de blé (Lladó *et al.*, 2013), la paille de pois (Shahsavari *et al.*, 2013), un milieu de culture riche à base de son de blé (Li *et al.*, 2012) ou la partie organique des déchets municipaux (Sayara *et al.*, 2011). La présence de molécules complexes dans la

source de nutriments et les modifications des propriétés physico-chimiques du sol entraînées par ces substrats pourraient ainsi également être déterminantes dans l'efficacité de la biostimulation. Il est d'ailleurs connu que la technique de bioremédiation *ex situ* par compostage entraîne le développement d'un consortium microbien riche et une élévation de la température qui ajoute une action chimique à la dégradation biologique des hydrocarbures (Daverey et Pakshirajan, 2011). De fait, l'utilisation de sources minérales d'azote (NH_4Cl) et phosphate ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) par Saponaro *et al.* (2002) dans une expérience de biostimulation en boues a mené à des résultats plus contrastés dont une absence d'effet significatif pour les HAP légers.

L'hypothèse d'un effet variable de l'ajout de nutriments rejoint l'idée que des études de faisabilité par site sont requises avant bioremédiation à plus grande échelle (Balba *et al.*, 1998). De même, l'effet contreproductif de l'ajout de certains additifs sur la dégradation des HAP a mené au constat de la nécessité d'évaluer leur efficacité avant application à plus grande échelle (Lladó *et al.*, 2013). En effet, une meilleure efficacité de l'approche de bioaugmentation fongique par rapport à la biostimulation a déjà été rapportée pour la remédiation des HAP (Mancera-López *et al.*, 2008). Une étude comparative sur des sols de différentes origines contaminés au diesel a d'ailleurs mené à la conclusion que la bioaugmentation était la stratégie la plus efficace, et que la biostimulation avec des sources minérales d'azote ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) et de phosphates (K_2HPO_4) était moins efficace que le processus d'atténuation naturelle (Bento *et al.*, 2005). Cette dernière étude est en parfait accord avec nos résultats.

Conclusion partielle

La démarche expérimentale décrite au sein de ce chapitre permet dans un premier temps d'évaluer les capacités de désorption des 30 souches de la mycothèque et de la souche modèle S19 sur le BaP. Les capacités de dégradation de cet hydrocarbure sont ensuite mesurées pour 14 souches sélectionnées dont S19. Ces tests de caractérisation des propriétés des souches mènent à l'observation que, parmi la collection fongique étudiée, les souches capables d'augmenter la solubilité apparente du BaP ne sont pas les mêmes que celles efficaces dans sa dégradation. Cela peut souligner une complémentarité des capacités de différentes souches fongiques pour la biodégradation des HAP et mettre en avant la nécessité d'utilisation de communautés microbiennes pour le développement de techniques de bioremédiation efficaces.

La seconde étape de la démarche expérimentale est l'étude des activités enzymatiques décrites dans la dégradation des HAP et dans le processus de stress oxydant afin d'analyser les liens de causalité possibles avec les capacités de dégradation du BaP des souches testées. Les résultats indiquent une corrélation des activités lignine- et manganèse-peroxydases extracellulaires avec les capacités de dégradation du BaP de la majorité des souches étudiées, ce qui n'avait été décrit que chez des champignons lignolytiques. Une souche extrêmement efficace dans la dégradation du BaP (souche 5) apparaît quant à elle utiliser une enzyme de la superfamille des cytochromes P450 pour catalyser l'oxydation de la molécule. Un lien plus complexe semble également exister avec les activités enzymatiques de détoxification du stress oxydant, notamment pour l'activité catalase qui augmente de manière quasi-systématique en présence de BaP. Ainsi la recherche des activités catalytiques responsables de la dégradation des HAP notamment chez les enzymes générant ou détruisant des ERO semble prometteuse et à poursuivre pour la compréhension des capacités des souches fongiques saprotrophes.

La troisième étape du plan expérimental est l'évaluation de l'impact de l'inoculation en sol de trois souches fongiques en présence de la microflore endogène sur la dégradation d'une contamination historique en HAP. Ces expériences soulignent l'effet positif de l'inoculation en sol de deux souches sur trois présentant des capacités élevées de dégradation du BaP en milieu minéral. Les taux de dégradation des HAP pour ces deux souches sont élevés considérant la période d'incubation de 30 jours notamment concernant les HAP de hautes masses molaires. Les différences de propriétés physico-chimiques et de microflore des deux sols testés ne semblent pas avoir eu d'impact majeur sur les résultats de dégradation. Les essais de biostimulation ont entraîné une diminution de l'effet positif de l'inoculation d'une souche fongique autochtone sur la dégradation des HAP. Ce résultat souligne la nécessité de tests préliminaires pour chaque site considéré avant traitement à grande échelle par les méthodes de bioremédiation. Les essais de bioaugmentation en échantillons de sol et l'étude de l'influence de différents nutriments décrits au sein de ce chapitre représentent ainsi une première étape dans le développement d'un protocole de bioremédiation à plus grande échelle (Sabaté *et al.*, 2004).

L'implication possible d'enzymes intracellulaires telles que les cytochromes P450 dans la dégradation des HAP mène à la problématique du processus d'incorporation de molécules aussi hydrophobes. Ainsi le travail décrit par le chapitre III concerne l'étude fondamentale du processus d'internalisation et de stockage intracellulaire avant dégradation du BaP chez la souche modèle S19.

Chapitre III : Mécanisme d'incorporation et de stockage intracellulaire des HAP chez *Fusarium solani*

Sommaire

Sommaire	109
Introduction	111
Matériels et méthodes	113
1. Produits chimiques.....	113
1.1. Solvants	113
1.2. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.....	113
1.3. Colorants des structures cellulaires fongiques.....	113
1.4. Inhibiteurs	114
2. Milieux de culture et inoculation	114
2.1. Composition des milieux de culture	114
2.2. Production du mycélium en phase active de croissance	115
3. Relation entre la solubilité aqueuse des HAP et leur incorporation par le mycélium	116
3.1. Incubation des cultures	116
3.2. Dispositif expérimental d'exposition aux HAP	116
3.3. Extraction et dosage des HAP en HPLC	117
3.4. Traitements mathématiques.....	118
4. Etudes du processus d'incorporation du BaP en microscopie optique	118
4.1. Incubation des cultures	118
4.2. Traitements pour la microscopie.....	118
4.2.1. Exposition aux colorants cellulaires	118
4.2.2. Exposition aux inhibiteurs	119
4.3. Observations en microscopie	119
4.3.1. Microscopie à épifluorescence.....	119

4.3.2. Microscopie confocale.....	119
Résultats et discussion	120
1. Relation entre la solubilité aqueuse des HAP et leur incorporation par le mycélium	120
2. Stockage intracellulaire du BaP	121
2.1. Localisation intracellulaire du stockage du BaP	122
2.2. Identification du compartiment cellulaire de stockage du BaP	123
3. Mécanisme de transport du BaP vers le site de stockage intracellulaire	125
3.1. Besoins énergétiques du processus d'incorporation du BaP	125
3.2. Dynamique du mécanisme d'incorporation du BaP.....	128
3.3. Implication du cytosquelette dans l'acheminement au site de stockage	129
4. Proposition d'un modèle d'incorporation des HAP par les cellules fongiques.....	131
Conclusion partielle	136

Introduction

Les expériences relatées dans le chapitre III concernent la compréhension des phénomènes impliqués dans le passage des molécules de HAP d'un état adsorbé sur le verre du milieu de culture aux sites de dégradation fongique (figure III 1). L'ensemble de ces études est réalisé en milieu minéral sous conditions contrôlées.

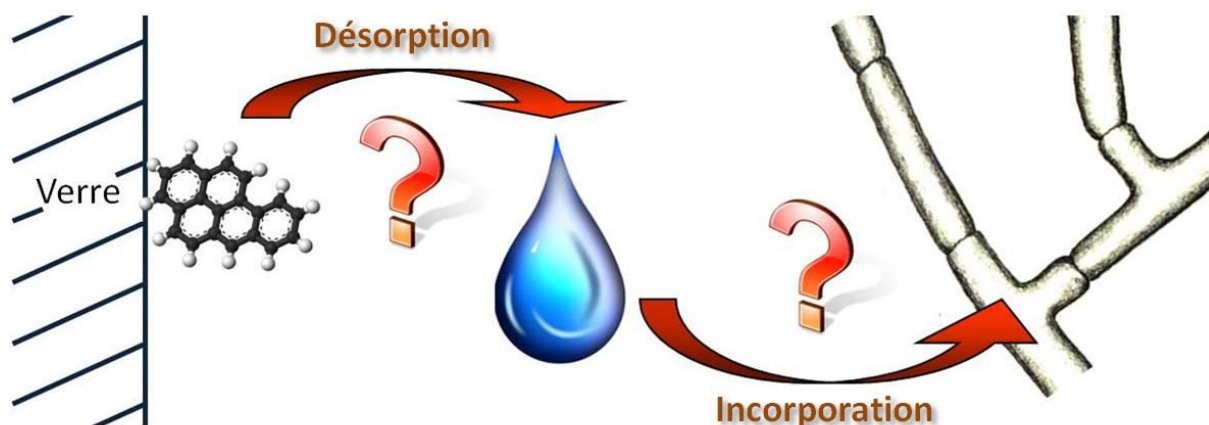


Figure III 1: Etapes de l'acheminement des HAP d'un état adsorbé au verre vers les sites de dégradation fongiques

Le lien entre la solubilité aqueuse des HAP et l'efficacité de leur incorporation doit tout d'abord être étudié afin de vérifier que la fraction soluble dans l'eau correspond bien à la fraction biodisponible concernant ces molécules. Pour cela, nous utilisons la quantité de HAP ayant accédé au compartiment intracellulaire comme indicateur de la fraction biodisponible. Dans le but de comprendre l'influence de la solubilité aqueuse des HAP sur leur biodisponibilité chez les champignons, la souche modèle S19 (*Fusarium solani*) est incubée en présence d'un HAP de faible masse molaire (le phénanthrène) et d'un HAP de haute masse molaire (le BaP). Afin de vérifier que la fraction des HAP soluble en phase aqueuse correspond bien à la fraction biodisponible, un dispositif de compartimentation du milieu de culture est inventé pour induire une séparation spatiale entre la source de HAP et le mycélium. Les quantités incorporées sont alors mesurées par dosage en HPLC. Ces quantités sont considérées comme l'expression des quantités biodisponibles.

Une fois que les molécules de HAP sont arrivées au contact des parois et membranes plasmiques des cellules fongiques se pose la question de l'entrée vers le compartiment intracellulaire. Des observations cytologiques ont révélé la présence de vésicules présentant la fluorescence caractéristique du BaP chez *F. solani* lors d'études précédentes (Rafin *et al.*, 2000). Il a été proposé que ces vésicules correspondent aux corps lipidiques des cellules

(Rafin *et al.*, 2000 ; Verdin *et al.*, 2005 a). Notre étude a pour objectif de vérifier la localisation intracellulaire de ces vésicules et l'identité des organites cellulaires impliqués dans le stockage du BaP par l'utilisation de la microscopie confocale et de marqueurs spécifiques de différents compartiments cellulaires.

Si le BaP est bien accumulé dans un compartiment intracellulaire de *F. solani*, cela implique la traversée de la paroi et de la membrane cellulaire suivie d'un acheminement vers le site de stockage. Il a longtemps été pensé que des mécanismes de transport actif n'étaient pas requis pour l'acquisition des composés aromatiques par les microorganismes du fait de leur faible polarité et de leur nature lipophile qui est censée leur permettre de traverser aisément les régions hydrophobes des membranes biologiques (Harwood et Gibson, 1986). Cependant des études physiologiques de l'incorporation de composés aromatiques comprenant des hydrocarbures aromatiques ont démontré l'implication de transports actifs chez les bactéries (Parales *et al.*, 2008). Certains transporteurs protéiques impliqués dans ce mécanisme ont même leur structure caractérisée (Hearn *et al.*, 2008). Les champignons sont des organismes eucaryotes et possèdent ainsi des mécanismes cellulaires très éloignés des bactéries. Cependant les mêmes obstacles physico-chimiques s'opposent à l'incorporation des HAP par leurs cellules. En effet des études calorimétriques sur des modèles de membranes lipidiques ont montré que la migration et l'absorption de l'anthracène, du pyrène et du BaP sont fortement entravées par le milieu aqueux séparant les HAP solides de ces biomembranes (Castelli *et al.*, 2002). Concernant d'autres molécules hydrophobes, le taux de dégradation des *n*-alcanes supérieur à leur taux de diffusion (Leahy et Colwell, 1990) suggère aussi l'existence d'un transport actif chez les cellules microbiennes (Van Hamme, 2004). De fait l'implication de transports actifs dans l'incorporation du dodécane par une souche fongique filamenteuse a été proposée (Lindley et Heydeman, 1983, 1986 a et b). Or le principe généralement retenu pour expliquer l'incorporation des HAP par les cellules fongiques est l'hypothèse d'une diffusion passive de ces molécules au travers des parois et membranes cellulaires (Verdin *et al.*, 2005 a). La recherche de l'implication de mécanismes autres que la diffusion passive dans l'entrée des HAP vers le compartiment intracellulaire fongique est donc à envisager.

Afin d'étudier les phases d'absorption et de transport intracellulaire du BaP par *F. solani*, notre étude repose sur des observations en microscopie à épifluorescence et confocale. Ces observations permettent la comparaison de l'effet d'inhibiteurs sur la localisation du marquage cellulaire induit par le BaP et des fluorochromes spécifiques de différents compartiments intracellulaires.

Le tableau III 1 présente les compartiments cellulaires mis en évidence par les fluorochromes utilisés dans cette étude ainsi que leur mode d'incorporation dans les cellules.

Tableau III 1: Compartiment cellulaire marqué par le Bodipy et le FM4-64 et processus impliqué dans leur incorporation

Fluorochrome	Compartiment cellulaire	Processus
Bodipy	Corps lipidiques	Diffusion passive
FM4-64	Voie endocytaire	Endocytose

Matériels et méthodes

1. Produits chimiques

1.1. Solvants

L'hexane est fourni par Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France), l'acétone, l'acétonitrile et le diméthylsulfoxyde (DMSO) par Panreac Química SA (Barcelone, Espagne), et le dichlorométhane, le méthanol et le chloroforme par Merck (Darmstadt, Allemagne).

1.2. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Le BaP et le phénanthrène utilisés respectivement comme HAP modèles de haute et de faible masse molaire sont obtenus auprès d'Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). La molécule de BaP présente des propriétés de fluorescence utilisée en microscopie dans le cadre de cette étude (excitation 295 nm, émission 403 nm).

1.3. Colorants des structures cellulaires fongiques

Le Rouge Congo (disodium 4-amino-3-[4-[4-(1-amino-4-sulfonato-naphthalène-2-yl)diazénylphényl]phényl]diazényl-naphthalène-1-sulfonate) utilisé en tant que marqueur des parois fongiques provient de Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Les maxima d'excitation et d'émission de cette molécule sont respectivement de 497 nm et de 614 nm.

Le Bodipy[®] 493/503 (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentaméthyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacène) est fourni par Life Technologies SAS (St Aubin, France). Ce fluorochrome vert présente l'avantage pour des marquages multiples d'émettre une fluorescence intense dans une gamme restreinte de longueurs d'onde. L'excitation maximale a lieu à une longueur d'onde de 493 nm et l'émission à 503 nm.

Le FM[®]4-64 (N-(3-triéthylammoniumpropyl)-4-(p-diéthylaminophénylhexatriényl)-pyridinium dibromure) est obtenu auprès d'Interchim (Montluçon, France). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission maximales de ce fluorochrome sont respectivement de 515 nm et de 640 nm.

1.4. Inhibiteurs

L'azoture de sodium (NaN₃) provient d'Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Il s'agit d'un inhibiteur métabolique perturbant notamment la production d'ATP par liaison aux atomes de fer trivalents dans les complexes porphyriques (Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds, 2003).

La cytochalasine B (7(S),20(R)-dihydroxy-16(R)-méthyl-10-phényl-24-oxa[14]cytochalasa-6(12),13(E),21(E)-triène-1,23-dione) est fournie par Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Etats Unis d'Amérique).

2. Milieux de culture et inoculation

2.1. Composition des milieux de culture

La souche modèle S19 (*Fusarium solani*) est conservée sur milieu MEA à une température de 22°C et suivant une photopériode de 12h/12h (chapitre II).

Le milieu minéral utilisé (MM2) est constitué des macroéléments suivants et constitue un tampon phosphate à 100 mM (Veignie *et al.*, 2002):

KCl	0,250 g.L ⁻¹
NaH ₂ PO ₄ . 2 H ₂ O	6,464 g.L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄ . 2 H ₂ O	10,408 g.L ⁻¹
MgSO ₄	0,244 g.L ⁻¹
NO ₃ NH ₄	1,000 g.L ⁻¹

Auxquels une solution d'oligoéléments est ajoutée avec comme concentrations finales:

ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	1,0 mg.L ⁻¹
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	0,1 mg.L ⁻¹
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	1,0 mg.L ⁻¹

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	$0,5 \text{ mg.L}^{-1}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$0,1 \text{ mg.L}^{-1}$
MoO_3	$0,2 \text{ mg.L}^{-1}$

Le chloramphénicol est ajouté sous forme de poudre afin d'obtenir une concentration finale de 120 mg.L^{-1} avant stérilisation par autoclave (121°C pendant 20 min). Un volume de solution mère de glucose (500 g.L^{-1}) est ajouté après autoclavage de sorte à obtenir une concentration finale de 20 g.L^{-1} .

Les milieux liquides qualifiés de "riches" dans ce chapitre sont composés de MM2 avec 10 g.L^{-1} de glucose et 1 g.L^{-1} d'extrait de levure (Fisher Scientific, Illkirch, France).

2.2. Production du mycélium en phase active de croissance

Les expériences d'incorporation des HAP nécessitent un mycélium en phase active de croissance qui est obtenu à partir de pré-cultures dans 50 mL de milieu liquide riche (figure III 2).

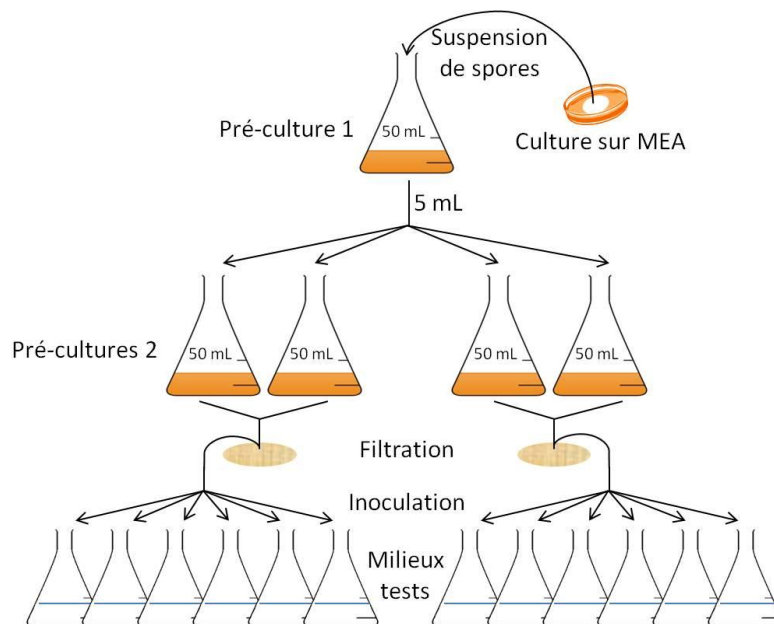


Figure III 2: Protocole de préparation d'un mycélium en phase active de croissance

L'inoculation des pré-cultures à une concentration initiale de $10^4 \text{ spores.mL}^{-1}$ est réalisée via une suspension de spores selon la méthode décrite dans le chapitre II. Après 3 jours d'incubation à 22°C sur un agitateur orbital (Infors, Massy, France) à 90 rpm, 5 mL de culture permettent d'inoculer de nouvelles pré-cultures de 50 mL en milieux liquides riches. Ces cultures sont incubées 24 h dans les mêmes conditions puis filtrées sur papier-filtre

(Fisherbrand, Ø 55 mm, 25 µm de porosité) avec un entonnoir Büchner monté sur fiole à vide. Le mycélium en phase active de croissance ainsi obtenu est mis en présence des HAP pour les différentes expériences.

3. Relation entre la solubilité aqueuse des HAP et leur incorporation par le mycélium

3.1. Incubation des cultures

Les milieux utilisés dans les expériences d'incorporation des HAP sont constitués de 25 mL de MM2 à une concentration de 20 g.L⁻¹ de glucose en erlenmeyer de 100 mL contenant 250 µg de HAP (§ 3.2). Une biomasse de 150 mg de mycélium en phase active de croissance (§ 2.2) est utilisée pour leur inoculation. Les cultures sont incubées 48 h à 22°C sur un agitateur orbital (170 rpm) avant les phases d'extraction des HAP. Chaque expérience est réalisée en triplicata.

3.2. Dispositif expérimental d'exposition aux HAP

Une méthode de compartimentation du milieu de culture par membrane de dialyse est développée (figure III 3). La différence principale entre les deux types de cultures est le mode d'introduction de la source de HAP, mais la quantité initiale de phénanthrène et de BaP utilisée est la même (250 µg pour 25 mL de MM2). Dans le cas des milieux non compartimentés, le dépôt de HAP est réalisé directement dans l'erlenmeyer au contact du verre, tandis que dans le cas de la compartimentation du milieu, les cristaux de HAP sont inclus en membrane de dialyse (porosité de 12 000 Da, Medicell International, Londres, Royaume Uni). Les milieux liquides non compartimentés permettent ainsi le contact direct entre les hyphes et le dépôt de HAP adsorbé sur le verre, tandis que la compartimentation restreint les échanges entre mycélium et cristaux de HAP aux molécules de tailles inférieures à 12 000 Da.

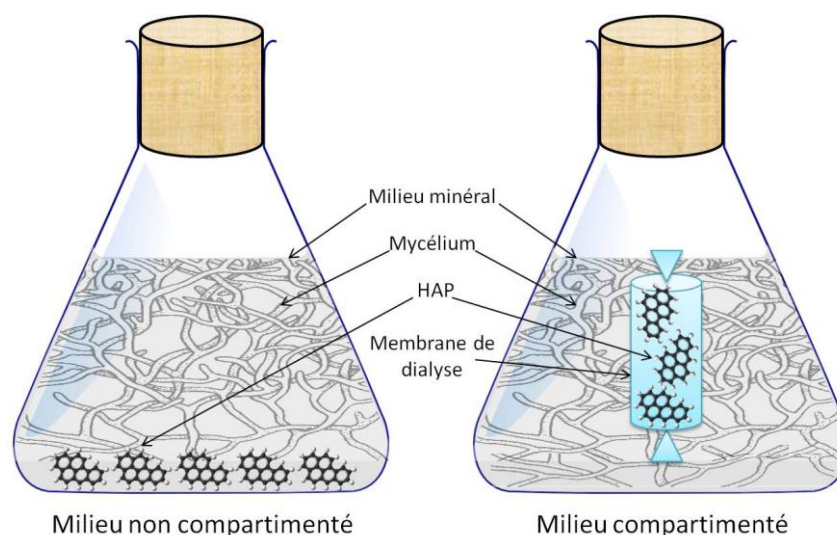


Figure III 3: Comparaison des dispositifs des milieux non compartimentés et compartimentés

Le dépôt de HAP au contact du verre de l'erenmeyer est réalisé par ajout d'une solution mère en acétone ($0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$). L'acétone est évaporée totalement en étuve (40°C) avant addition du milieu minéral.

L'inclusion en membrane de dialyse consiste en l'ajout de la solution mère de HAP ($0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$) dans 7 mL de MM2 (20 g.L^{-1} de glucose) contenus dans une membrane de dialyse. Du fait de la grande hydrophobie de ces molécules, des cristaux de HAP apparaissent dès le contact avec le milieu aqueux. Le système est ensuite laissé dialyser 24 h dans 100 mL de MM2 à 20 g.L^{-1} en glucose afin de diluer l'acétone de la solution mère. La membrane de dialyse contenant les cristaux de BaP est enfin introduite dans une culture fongique.

3.3. Extraction et dosage des HAP en HPLC

A la fin de l'incubation de 48 h, les cultures sont filtrées sur papier-filtre (Fisherbrand, $\text{Ø } 55 \text{ mm}$, $25 \text{ }\mu\text{m}$ de porosité) avec un entonnoir Büchner monté sur fiole à vide. Les mycéliums ainsi obtenus sont lavés rapidement trois fois avec un mélange de dichlorométhane:hexane (1:1) afin d'éliminer les HAP adsorbés à la surface des hyphes. Les biomasses sont ensuite lyophilisées (Alpha 2-4 LD plus, Bioblock Scientific) durant 24 h et les masses sèches sont mesurées (balance électronique Precisa XT220A, limite de détection $0,0001 \text{ g}$).

L'extraction des quantités de HAP incorporées consiste en cinq étapes d'immersion des biomasses lyophilisées dans 5 mL de solvant chauffé à 70°C durant 4 min sous agitation (170 rpm). La composition des solvants utilisés est la suivante : 1 \times chloroforme:méthanol (2:1), 2 \times chloroforme:méthanol (1:1), 1 \times acétone:méthanol (1:1), 1 \times chloroforme:méthanol (1:1).

Après concentration par évaporation en étuve à 40°C, la fraction organique est récupérée dans 20 mL de mélange dichlorométhane:méthanol (1:1).

Les concentrations en HAP sont déterminées en HPLC (Waters 600 Controller). Le système contient une colonne greffée en C18 Waters XTerra[®], 5 µm et un détecteur Waters 996 Photo Diode Array Detector. La phase mobile utilisée est composée d'un mélange acétonitrile:eau (90:10 v/v) à concentration isocratique et le débit imposé est de 1 mL.min⁻¹. La détection des HAP est réalisée par absorbance UV. L'intégration de l'aire des pics obtenus à 254 nm permet de calculer les concentrations en phénanthrène et à 380 nm celles en BaP par comparaison à des standards.

3.4. Traitements mathématiques

Le rapport "masse de HAP/biomasse sèche" (µg.mg⁻¹) est calculé pour chaque culture. Les résultats sont exprimés sous la forme des moyennes obtenues par triplicatas et de leurs écarts types. Le test t non apparié de Student est utilisé afin de distinguer les moyennes significativement différentes au seuil de risque de 5%. Des lettres symbolisent les groupes statistiquement différents.

4. Etudes du processus d'incorporation du BaP en microscopie optique

4.1. Incubation des cultures

Concernant les observations en microscopie, les milieux sont constitués de 5 mL de MM2 à une concentration de 20 g.L⁻¹ de glucose en erlenmeyer de 25 mL. Il s'agit dans tous les cas de milieux non compartimentés. La quantité initiale de BaP est de 10 µg déposée directement sur le verre comme décrit dans la § 3.2. La biomasse utilisée pour l'inoculation est de 20 mg de mycélium en phase active de croissance (§ 2.2). Le temps d'incubation en présence de BaP avant observation est de 24 h.

4.2. Traitements pour la microscopie

4.2.1. Exposition aux colorants cellulaires

Le colorant pariétal Rouge Congo est ajouté juste avant l'observation en microscopie à raison de 5 µL de solution mère (10 µg.mL⁻¹ en eau distillée) pour 10 µL d'échantillon.

Le marqueur des corps lipidiques Bodipy est apporté sous la forme d'une solution mère (5 mM en DMSO) aux cultures fongiques à une concentration finale de 0,1 μM 4h avant observation en microscopie.

Le marqueur des compartiments de l'endocytose FM4-64 est ajouté sous forme d'une solution mère (1,65 mM en eau:éthanol 1:1) dans les cultures à une concentration finale de 7,5 mM 4h avant observation en microscopie.

4.2.2. Exposition aux inhibiteurs

Un inhibiteur métabolique (l'azoture de sodium) et un perturbateur du cytosquelette (la cytochalasine B) sont utilisés pour l'étude de l'incorporation du BaP en microscopie. Dans les expériences de notre étude, le mycélium est mis au contact de l'un des inhibiteurs dans un milieu minéral (MM2) ne présentant pas de glucose pendant 4h. La concentration utilisée est de 5 ou de 100 mM pour l'azoture de sodium et de 0,1 g.L^{-1} pour la cytochalasine B. L'ensemble de la culture est ensuite transféré dans un autre flacon contenant le BaP.

4.3. Observations en microscopie

4.3.1. Microscopie à épifluorescence

Les images de microscopie à épifluorescence sont réalisées à l'aide d'un microscope AxioStar plus HB050 (excitation: 345 nm, émission: 485 nm pour le BaP et 520 nm pour le Rouge Congo) et d'un appareil photo numérique (Canon Power Shot A640).

4.3.2. Microscopie confocale

Les images de microscopie confocale sont réalisées en collaboration avec l'équipe INSERM U1003 de Lille (France). L'appareil utilisé est un microscope confocal à balayage laser LSM 780 (Zeiss, Le Pecq, France) connecté à un statif inversé motorisé AxioObserver Z1 comprenant un objectif de contraste en interférence de phase (Plan-Apochromat X40/1,3 oil). Les différents canaux sont excités et collectés séparément en mode "line scan". Les mêmes conditions instrumentales sont utilisées au cours des différentes expériences.

Résultats et discussion

1. Relation entre la solubilité aqueuse des HAP et leur incorporation par le mycélium

Le dosage des quantités de phénanthrène et de BaP incorporées dans les biomasses fongiques après 48 h d'incubation en milieu non compartimenté ou compartimenté indique une différence de comportement entre les deux HAP modèles (figure III 4).

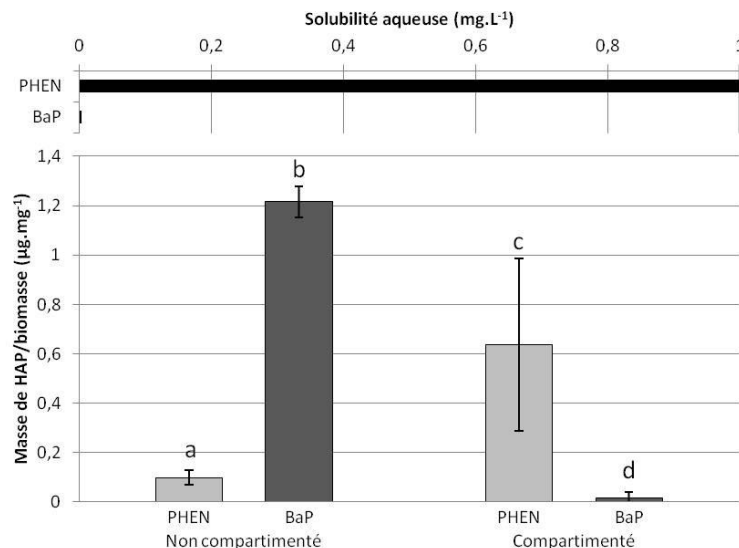


Figure III 4: Masses de phénanthrène (PHEN) et de BaP incorporées par la biomasse en milieu non compartimenté et compartimenté comparativement à leur solubilité aqueuse respective

Les résultats montrent en effet de façon claire qu'en absence de compartimentation, le BaP est incorporé de façon significativement supérieure au phénanthrène par les biomasses fongiques. La teneur moyenne obtenue pour le BaP ($1,2 \mu\text{g.mg}^{-1}$) est en effet douze fois supérieure à la valeur du phénanthrène ($0,1 \mu\text{g.mg}^{-1}$). Ce résultat s'oppose au principe selon lequel un HAP est d'autant plus biodisponible que sa solubilité aqueuse est importante. La solubilité du phénanthrène dans l'eau est en effet 400 fois supérieure à celle du BaP dans les mêmes conditions de température (25°C). Un autre phénomène que la diffusion passive en milieu aqueux doit donc intervenir dans l'incorporation des HAP par les cellules de *F. solani*.

Le dispositif de compartimentation est conçu pour que les hyphes fongiques n'aient accès qu'à la fraction des HAP solubilisée en phase aqueuse. Une influence fongique possible sur la biodisponibilité des HAP dans ces conditions expérimentales est la production de tensioactifs biologiques (chapitre II) de taille inférieure à $12\ 000 \text{ Da}$ (porosité de la membrane de dialyse). Des tensioactifs biologiques de tailles très variables allant de quelques centaines de daltons au mégadalton sont en effet produits par les microorganismes (Rosenberg et Ron,

1999 ; Gautam et Tyagi, 2006). La membrane de dialyse est donc susceptible de perturber le système de solubilisation du BaP par les tensioactifs biologiques en ne laissant passer que les molécules de taille inférieure à 12 000 Da vers les cristaux de BaP.

Ce dispositif de compartimentation du milieu semble en tous cas rétablir le principe de biodisponibilité selon la solubilité aqueuse des molécules puisque la teneur moyenne obtenue pour le phénanthrène ($0,64 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) est 32 fois supérieure à celle du BaP ($0,02 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$). Cette expérience révèle ainsi un mécanisme d'incorporation du BaP qui ne repose pas sur le principe de diffusion passive et intervient dans le cas d'un contact direct entre le mycélium et la source de contamination en HAP.

La proportion très importante (82,9%) de la quantité initiale de BaP incorporée par les biomasses fongiques après 48 h de contact direct suggère fortement l'implication d'un mécanisme de transport actif. De façon générale, les phénomènes d'incorporation de composés hydrophobes dans les cellules eucaryotes sont peu travaillés et sujets à controverses. Trois hypothèses ont été proposées dans la littérature à notre connaissance pour expliquer l'incorporation des hydrocarbures dans les cellules fongiques. Premièrement Lindey et Heydemann (1983, 1986 a et b) ont démontré que le transport de molécules hydrophobes *n*-alcanes au travers des membranes cellulaires correspond à un mécanisme actif d'incorporation chez le champignon filamenteux *Cladosporium resinae*. Secondement un phénomène de partitionnement des HAP entre les membranes plasmiques et les lipides des parois (Meissel *et al.*, 1973) ou avec des lipoprotéines extracellulaires (Plant *et al.*, 1985) a été proposé. Troisièmement Verdin *et al.* (2005 a) ont émis l'hypothèse d'un processus de diffusion passive pour expliquer l'incorporation du BaP dans les hyphes de *F. solani*. Ainsi les résultats obtenus dans le cadre de notre étude ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes d'entrée des HAP dans les cellules fongiques en indiquant l'implication d'un transport actif.

2. Stockage intracellulaire du BaP

Afin de mieux comprendre le mécanisme de stockage du BaP au niveau des hyphes fongiques, des études de microscopie impliquant des marqueurs fluorescents de compartiments cellulaires sont entreprises.

2.1. Localisation intracellulaire du stockage du BaP

Un pré-requis à l'étude de l'incorporation du BaP par les cellules fongiques est la vérification de la localisation intracellulaire de son site de stockage. Deux techniques différentes de microscopie (à épifluorescence et confocale) mettant à profit les propriétés de fluorescence naturelles du BaP (maximum d'excitation : 295 nm, émission : 403 nm) sont utilisées afin de localiser cet HAP par rapport aux délimitations cellulaires (figure III 5).

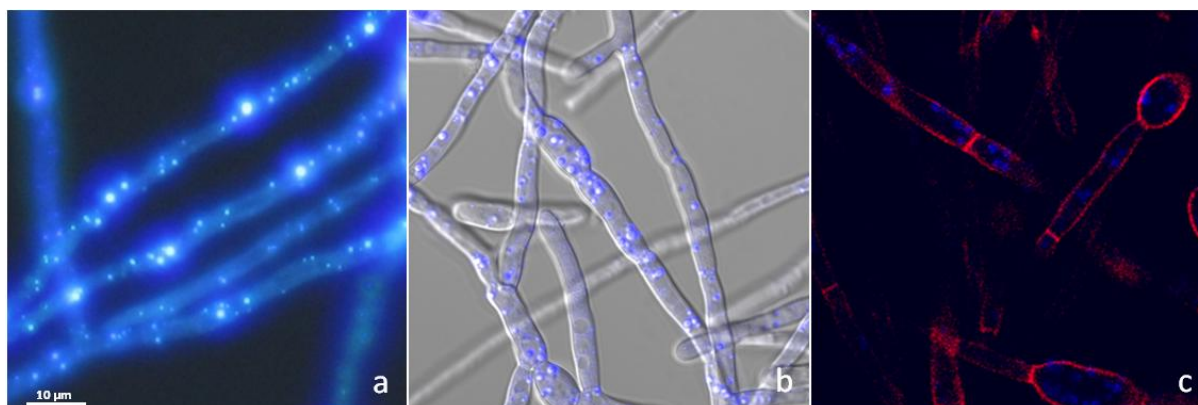


Figure III 5: Marquage fluorescent bleu entraîné par le BaP au niveau des hyphes de *Fusarium solani* observé par trois techniques de microscopie. a = Microscopie à épifluorescence ; b = Couplage du contraste interférentiel et de la fluorescence en microscopie confocale ; c = Double marquage avec le marqueur pariétal Rouge Congo en microscopie confocale

La microscopie à épifluorescence permet d'observer clairement la présence du marquage fluorescent bleu caractéristique du BaP au niveau de vésicules associées aux hyphes fongiques (figure III 5 a) après 24h d'incubation en présence du HAP. De telles vésicules ont déjà été décrites précédemment lors de l'exposition de mycéliums au BaP (Rafin *et al.*, 2000 ; Verdin *et al.*, 2005 a ; Wu *et al.*, 2009 ; Thion *et al.*, 2012). Afin de confirmer la localisation intracellulaire des vésicules présentant le marquage fluorescent du BaP, il est nécessaire d'utiliser une technique de microscopie permettant une sélectivité dans la profondeur de champs. La microscopie confocale permet ainsi de voir distinctement que les vésicules colorées en bleu sont situées exclusivement dans les limites cellulaires visibles en contraste interférentiel (figure III 5 b) et de confirmer leur localisation au sein des cellules dans un même plan optique lorsque les parois sont marquées au Rouge Congo (figure III 5 c). Ce fluorochrome rouge est en effet utilisé pour mettre en évidence les parois fongiques de par son affinité pour la chitine (Roncero et Duran, 1985), les structures amyloïdes (Slifkin et Cumbie, 1988) et les protéines (Khurana *et al.*, 2001) qui la composent.

2.2. Identification du compartiment cellulaire de stockage du BaP

Le stockage du BaP ayant lieu au sein des cellules fongiques, l'étape suivante consiste en l'identification du compartiment intracellulaire impliqué. Cette étude est réalisée par des expériences de co-marquages et d'observations en microscopie confocale. Du fait du caractère hautement hydrophobe du BaP, cette molécule a chimiquement tendance à s'accumuler dans des compartiments lipidiques. Les marqueurs fluorescents sont ainsi choisis délibérément pour leur nature apolaire. Le Bodipy est un fluorochrome vert marquant spécifiquement les corps lipidiques (Gocze et Freeman, 1994) et dont les propriétés de fluorescences sont induites par liaison aux lipides neutres. Le FM4-64 est un marqueur membranaire de fluorescence rouge utilisé pour l'étude des compartiments impliqués dans le processus d'endocytose notamment chez les champignons (Vida et Emr, 1995 ; Fischer-Parton *et al.*, 2000 ; Read et Kalkman, 2003). En effet l'induction de ses propriétés de fluorescence par son insertion dans les membranes biologiques présente l'avantage d'un faible bruit de fond lors des observations en microscopie. L'existence de l'endocytose chez les champignons filamenteux a longtemps été sujette à débats (Read et Kalkman, 2003). D'abord étudiés chez les levures (Munn, 2001 ; Bourett *et al.*, 2006), les mécanismes moléculaires de l'endocytose commencent à être décrits également chez les espèces filamenteuses (Peñalva, 2010). Ainsi l'étude de l'implication des compartiments de la voie endocyttaire dans l'incorporation du BaP chez la souche filamenteuse *F. solani* paraît intéressante.

Le triple marquage du mycélium au BaP, Bodipy et FM4-64 suivi de l'observation en microscopie confocale des longueurs d'onde d'émission spécifiques à chaque marqueur permet la comparaison de leurs localisations intracellulaires (figure III 6).

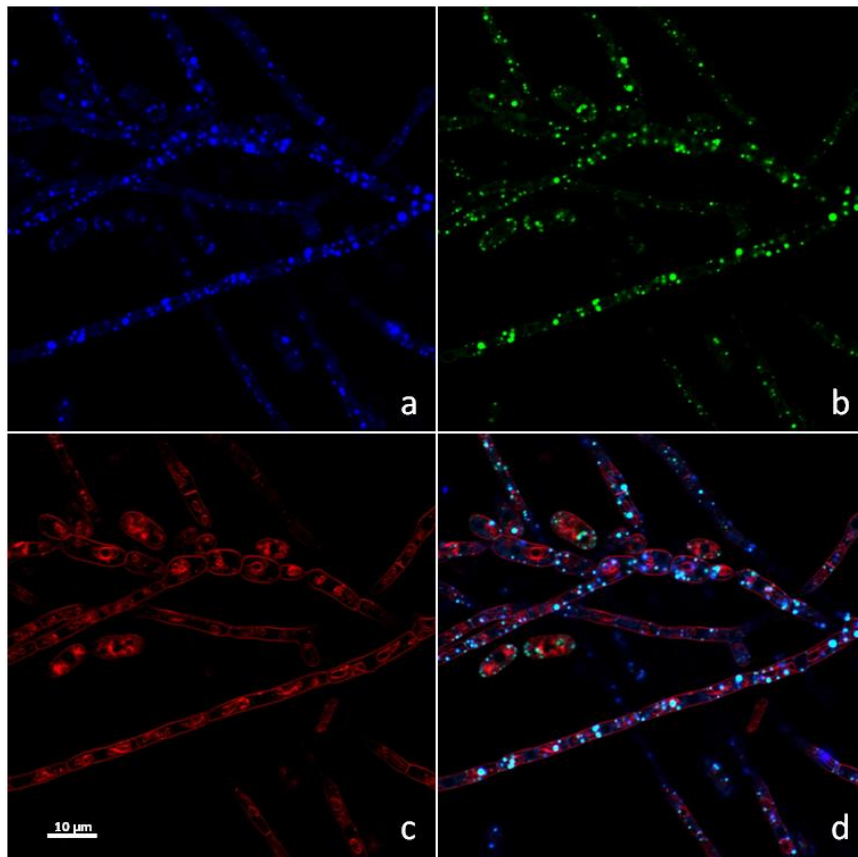


Figure III 6: Localisation dans un même plan optique de trois molécules fluorescentes par microscopie confocale dans les cellules de *Fusarium solani*. a = BaP (canal 405 nm) ; b = Bodipy (488 nm) ; c = FM4-64 (561 nm) ; d = triple marquage

La comparaison des marquages cellulaires entraînés par le BaP (figure III 6 a) et le Bodipy (figure III 6 b) révèle très clairement la co-localisation parfaite de ces composés (figure III 6 d). Cette observation nous permet de conclure que les corps lipidiques constituent le site de stockage intracellulaire du BaP chez *F. solani*. Cette identification du site de stockage est conforme aux hypothèses déjà émises (Rafin *et al.*, 2000 ; Verdin *et al.*, 2005 a).

Par contre la fluorescence bleue du BaP (figure III 6 a) ne co-localise jamais avec la fluorescence rouge du FM4-64 (figure III 6 c et d). Cette observation indique que le BaP ne transite pas par les compartiments de la voie classique de transport endocytaire aboutissant aux vacuoles. Cependant la présence de marquage intracellulaire par le FM4-64 confirme l'existence du mécanisme d'endocytose chez *F. solani* comme cela a déjà été démontré chez d'autres espèces fongiques (Basrai *et al.*, 1990 ; Vida et Emr, 1995 ; Yamashita et May, 1998 ; Fischer-Parton *et al.*, 2000 ; Atkinson *et al.*, 2002 ; Read et Kalkman, 2003).

3. Mécanisme de transport du BaP vers le site de stockage intracellulaire

Avant leur stockage dans un compartiment intracellulaire, les molécules doivent franchir les barrières cellulaires que représentent la paroi fongique et la membrane plasmique. Les connaissances sur les mécanismes d'entrée des marqueurs Bodipy et FM4-64 à l'intérieur des cellules sont mises à profit dans les expériences suivantes afin de déterminer les propriétés du processus d'incorporation du BaP.

3.1. Besoins énergétiques du processus d'incorporation du BaP

Afin de déterminer si un processus actif est impliqué dans l'incorporation du BaP par les cellules de *F. solani*, un inhibiteur métabolique (NaN_3) est utilisé à une concentration élevée de 100 mM en combinaison avec les marqueurs de compartiments cellulaires (FM4-64 et Bodipy). Concernant les marqueurs fluorescents, le Bodipy est décrit pour diffuser rapidement au travers des parois et membranes cellulaires (Johnson *et al.*, 1996 ; Kamisaka *et al.*, 1999 ; Saito *et al.*, 2004). Il sert dans cette étude de molécule témoin de l'effet du NaN_3 sur les processus de diffusion passive. A l'inverse, le FM4-64 est connu pour sa spécificité du processus d'endocytose et permet de révéler l'effet de l'inhibiteur sur un processus actif. La concentration utilisée (100 mM) en azoture de sodium a précédemment été décrite pour inhiber l'endocytose chez un champignon filamenteux (Read et Kalkman, 2003). La figure III 7 permet ainsi de comparer en microscopie confocale les conséquences de l'exposition du mycélium à une forte dose d'azoture de sodium sur l'incorporation du BaP et de molécules caractéristiques d'un transport actif (FM4-64) et d'une diffusion passive (Bodipy).

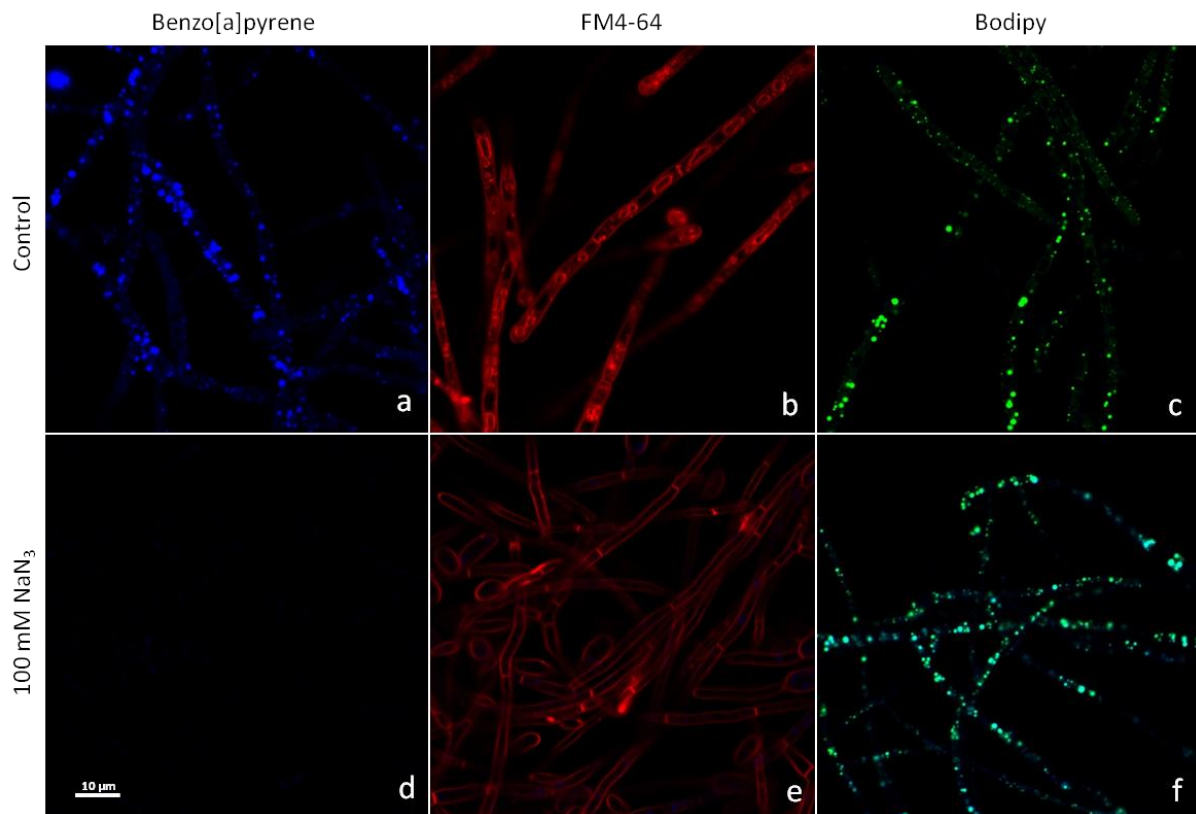


Figure III 7: Comparaison des marquages cellulaires entraînés par le BaP (a, d), le FM4-64 (b, e) et le Bodipy (c, f) dans les témoins (a, b, c) et en présence de 100 mM d'azoture de sodium (d, e, f) chez *Fusarium solani*

La localisation des marqueurs fluorescents confirme l'inhibition spécifique des processus actifs d'incorporation par le traitement à l'azoture de sodium. L'entrée du FM4-64 est en effet bloquée, ce qui entraîne un marquage uniquement au niveau des membranes plasmiques (figure III 7 e) et non plus des compartiments intracellulaires de la voie endocytaire (figure III 7 b). Le marquage des corps lipidiques par le Bodipy (figure III 7 c) n'est pas altéré en présence d'azoture de sodium (figure III 7 f). Cette observation souligne que l'exposition des hyphes à cette concentration de NaN_3 ne perturbe pas l'entrée des molécules par diffusion passive. De façon intéressante, le marquage bleu des corps lipidiques entraîné par le BaP (figure III 7 a) disparaît complètement en présence de 100 mM de NaN_3 (figure III 7 d). Cette observation indique qu'un mécanisme actif est impliqué dans l'entrée du BaP à l'intérieur des cellules et son acheminement vers les corps lipidiques.

Si l'azoture de sodium agit bien sur un transport actif du BaP vers les compartiments intracellulaires, son effet doit être dépendant de la dose d'exposition. La figure III 8 présente l'observation en microscopie à épifluorescence des marquages obtenus en présence de BaP chez des mycéliums de *F. solani* exposés à différentes concentrations d'azoture de sodium.

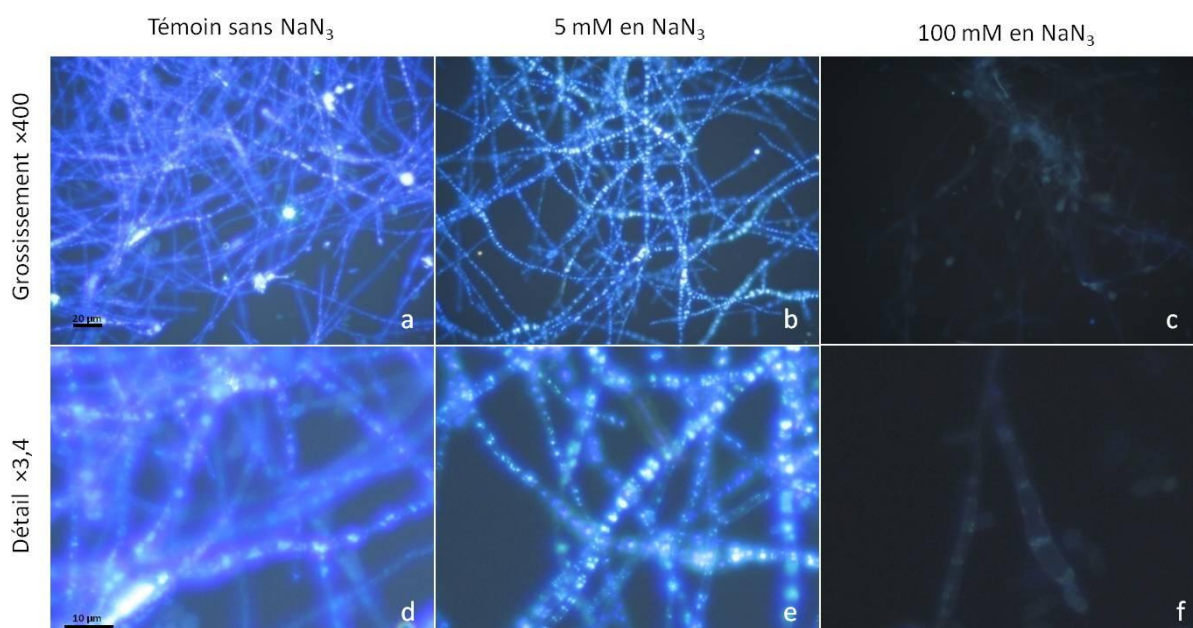


Figure III 8: Effets de trois concentrations en azoture de sodium (0, 5 et 100 mM) sur le marquage cellulaire dû au BaP en microscopie à épifluorescence au grossissement X400 (a-c) et après grossissement d'un détail de l'image 3,4 fois (d-f)

Les images de la figure III 8 permettent d'observer les effets d'une concentration faible (5 mM) et forte (100 mM) en azoture de sodium sur le marquage cellulaire entraîné par le BaP chez *F. solani*. Rappelons que le mycélium témoin exposé au BaP sans inhibiteur métabolique présente une fluorescence bleue très intense et d'apparence floue en microscopie à épifluorescence (figures III 8 a et d). L'ajout de 5 mM d'azoture de sodium n'empêche pas le marquage bleu des corps lipidiques, ce qui signifie que l'entrée du BaP dans les cellules n'est pas inhibée à cette concentration (figures III 8 b et e). Cette concentration de 5 mM en azoture de sodium est pourtant supérieure à certaines concentrations utilisées dans la littérature sur des champignons filamenteux (1,54 mM chez Kamisaka et Noda, 2001 et chez Verdin *et al.*, 2005 a ; entre 0 et 1 mM chez Verdin *et al.*, 2004 ; 0,154 mM chez Ramachandran *et al.*, 2008). Ces faibles concentrations sont ainsi susceptibles d'inhiber le développement fongique macroscopique sans pour autant bloquer totalement les processus cellulaires particulièrement chez des cellules protégées par une paroi. Une autre étude (Lozovaya *et al.*, 2006) portant sur la dégradation de la lignine par une souche de la même espèce que notre modèle d'étude (*Fusarium solani*) utilise d'ailleurs une concentration supérieure en azoture de sodium (20 mM). L'apparence du marquage fluorescent obtenu dans notre étude à 5 mM est cependant déjà différente du témoin avec l'impression d'une meilleure netteté des contours des corps lipidiques. La technique de microscopie à épifluorescence ne permet malheureusement pas de distinguer si cette différence est liée à une diminution du bruit au

niveau pariétal ou cytoplasmique. Cette différence d'apparence pourrait souligner le début d'un effet inhibiteur à la concentration de 5 mM, qui n'est cependant pas suffisant pour stopper le mécanisme d'incorporation et de transport intracellulaire du BaP vers les corps lipidiques. L'exposition à 100 mM d'azote de sodium (figure III 8 c et f) élimine complètement le marquage bleu des corps lipidiques généré par le BaP en accord avec ce qui a été observé en microscopie confocale dans les mêmes conditions (figure III 7 d). Cette observation d'un effet dose-réponse de l'exposition à l'azote de sodium sur le marquage intracellulaire entraîné par le BaP confirme la nature active du transport transmembranaire impliqué dans son incorporation chez *F. solani*.

3.2. Dynamique du mécanisme d'incorporation du BaP

La figure III 9 présente une étude cinétique comparative des zones mycéliennes impliquées dans l'incorporation du FM4-64 et du BaP au cours du temps. Rappelons que le FM4-64 est utilisé comme marqueur d'un processus actif d'incorporation (l'endocytose).

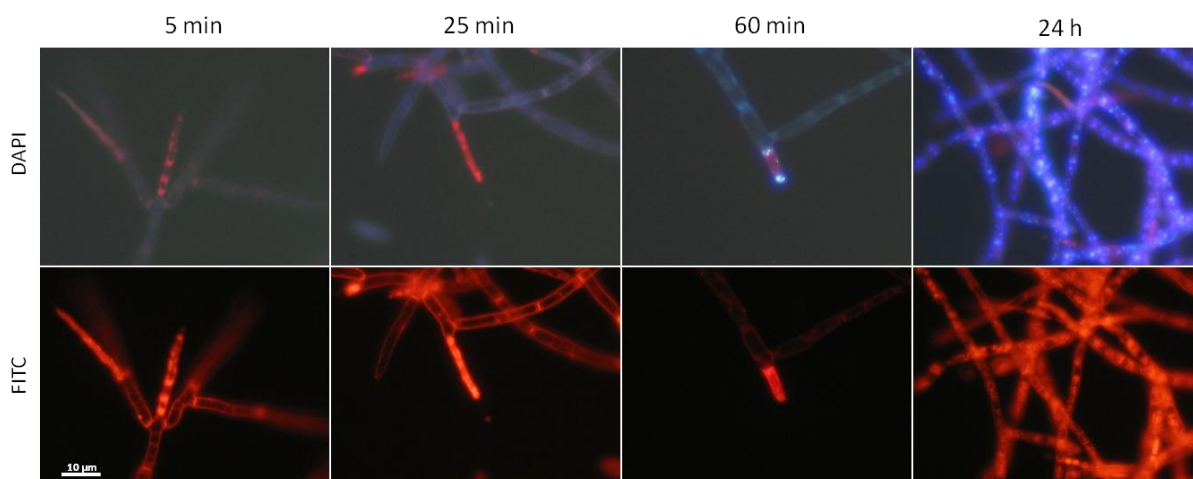


Figure III 9: Cinétique comparative de l'incorporation du BaP (filtre 405 nm) et du FM4-64 (561 nm) dans les hyphes de *Fusarium solani* en microscopie à épifluorescence

Des observations régulières en microscopie à épifluorescence après mise en contact simultanée d'un mycélium de *F. solani* avec du FM4-64 et du BaP permettent une étude comparative spatiale et temporelle des marquages cellulaires obtenus sur une durée de 24 h. La figure III 9 présente les images les plus représentatives des différentes phases observées. Le marquage cellulaire rouge dû au FM4-64 apparaît rapidement après moins de 5 min d'exposition, tandis 25 min sont nécessaires pour entraîner une coloration intracellulaire bleue par le BaP. Cette différence peut provenir de la solubilité aqueuse beaucoup plus importante du FM4-64 qui lui permet d'atteindre plus rapidement les surfaces cellulaires. Les signaux

fluorescents obtenus pour les deux sondes apparaissent d'abord au niveau des apex et des sites de branchement des hyphes. Cela est particulièrement visible sur le cliché pris après 60 min. Cette observation renforce l'hypothèse d'un mécanisme actif d'incorporation du BaP étant donné que les zones concernées (apex et sites de ramification) sont impliquées dans la croissance fongique et présentent ainsi des niveaux importants d'activité métabolique (Gow, 1995). Après 24 h, l'ensemble des hyphes présente les deux marquages au niveau de toute leur longueur. Il y a donc une forte similarité des régions concernées dans l'incorporation des deux molécules au cours du temps, bien que leur site de stockage intracellulaire soient différents (§ 2.2). L'incorporation relativement rapide du BaP dans les cellules fongiques (moins de 25 min) pourrait indiquer que le mécanisme actif impliqué dans son transport est une voie constitutive utilisée pour des molécules naturelles de nature hydrophobe. Des transports actifs sensibles à l'azoture de sodium ont en effet été décrits dans le métabolisme fongique des lipides chez *Mortierella ramanianna* var. *angulispora* (Kamisaka et Noda, 2001).

3.3. Implication du cytosquelette dans l'acheminement au site de stockage

L'influence de la cytochalasine B sur la localisation cellulaire du BaP est étudiée en microscopie confocale (figure III 10) afin de savoir si le cytosquelette est impliqué dans le mécanisme d'incorporation de cet HAP. Le Bodipy est également utilisé afin de pouvoir observer la présence et la morphologie des corps lipidiques chez les hyphes exposés à ce désorganisateur du cytosquelette. Les cytochalasines sont en effet connues pour leurs propriétés d'inhibition de la polymérisation des réseaux d'actines et sont ainsi utilisées dans l'étude *in vivo* des fonctions du cytosquelette notamment chez les champignons filamenteux (Srinivasan *et al.*, 1996 ; Torralba *et al.*, 1998). Dans l'une de ces études, l'exposition du champignon filamenteux *Aspergillus nidulans* à une gamme de concentrations en cytochalasine A (10, 20, 50, 80 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) a permis d'obtenir les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne au cours du temps (Torralba *et al.*, 1998). La concentration la plus élevée en cytochalasine (0,1 g.L^{-1}) est choisie dans nos expériences, car Torralba *et al.* (1998) montrent que cette concentration permet une inhibition totale de la croissance fongique jusque 48 h après le début de l'exposition mycélienne. Cette durée d'efficacité est adaptée à notre protocole expérimental puisque le temps d'exposition du mycélium au BaP avant observation en microscopie est de 24 h.

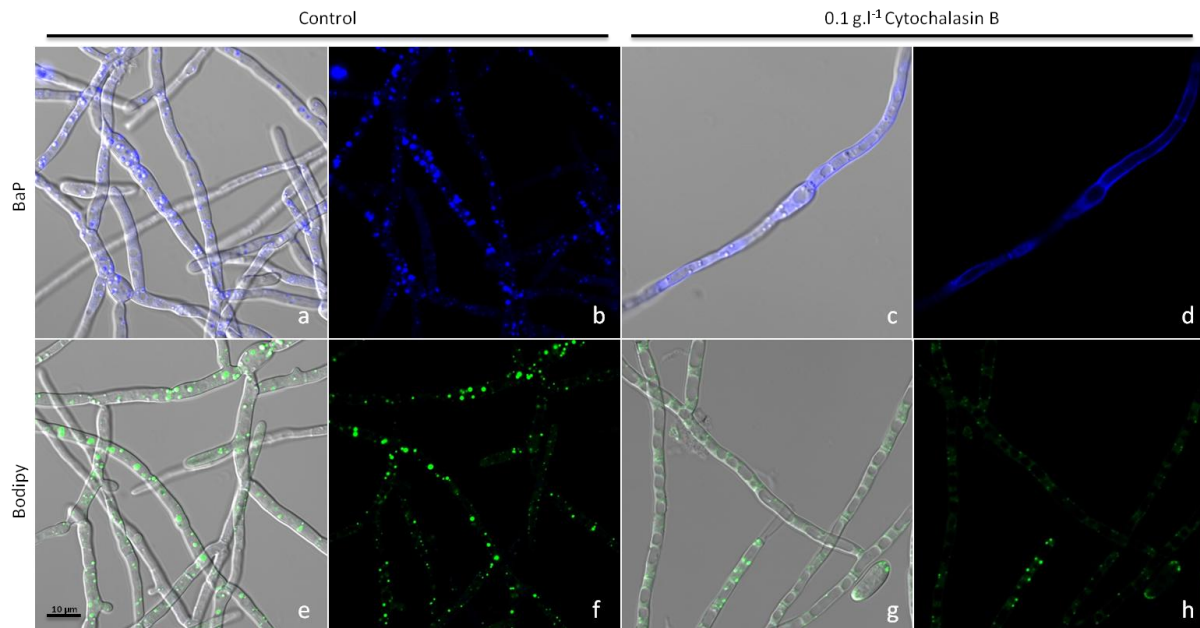


Figure III 10: Comparaison des marquages cellulaires entraînés par le BaP (a-d) et le Bodipy (e-h) dans les témoins (a, b, e, f) et en présence de 0,1 g.L⁻¹ de cytochalasine B, un perturbateur du cytosquelette (c, d, g et h).

La figure III 10 montre que le Bodipy marque les corps lipidiques également en présence de cytochalasine B à 0,1 g.L⁻¹ (figure III 10 g et h), ce qui confirme ce fluorochrome diffuse de façon passive vers ce compartiment intracellulaire. Ce mode d'entrée dans les cellules est également souligné par la quasi-instantanéité de la coloration des corps lipidiques. La différence de marquage par le Bodipy entre le témoin (figure III 10 e et f) et les hyphes traités à la cytochalasine B (figure III 10 g et h) résulte de l'effet du désorganisateur de cytosquelette sur la morphologie cellulaire comme cela est montré par l'observation en contraste interférentiel (figure III 10 g). Le petit nombre de corps lipidiques correspond probablement à ceux formés avant le traitement à la cytochalasine B. Ces corps lipidiques sont repoussés vers les limites externes des cellules par de grandes vacuoles résultant de l'effet du perturbateur de cytosquelette. Ce résultat suggère que le réseau d'actine pourrait être impliqué dans la synthèse et le mouvement des corps lipidiques comme cela est décrit dans la littérature pour des cellules eucaryotes (Welte, 2009).

Au contraire, l'incorporation du BaP apparaît bloquée chez les hyphes exposés à la cytochalasine B (figure III 10 c et d). En effet la fluorescence bleue émise par cette molécule se retrouve uniquement localisée au niveau des parois ou membranes cellulaires et non plus au sein des corps lipidiques comme chez le témoin (figure III 10 a et b). Cette observation souligne la participation du réseau d'actine dans l'incorporation intracellulaire du BaP chez *F. solani*. Un transport actif vers les corps lipidiques mais indépendant du réseau d'actine a

été décrit chez le champignon oléagineux *Mortierella ramanniana* var. *angulispora* pour d'autres composés hydrophobes exogènes tels que les phospholipides (Kamisaka *et al.*, 1999 ; Kamisaka et Noda, 2001).

C'est la première fois à notre connaissance qu'un processus actif impliquant le réseau d'actine de façon semblable à l'endocytose est décrit pour son rôle dans l'incorporation d'un HAP de haute masse molaire (BaP) chez un champignon filamenteux. Cependant dans notre étude, l'absence de co-localisation entre les marquages du BaP et du FM4-64 semble indiquer l'existence d'une autre voie que l'endocytose classique pour le transit intracellulaire de ce contaminant. Nos résultats paraissent en accord avec l'hypothèse du modèle des flux vésiculaires décrit par Zweytick *et al.* (2000) où le transport du BaP aurait lieu via le flux vésiculaire vers des structures lipidiques pré-existantes servant de compartiments de stockage. Notre étude montre ainsi que l'incorporation des HAP au sein des cellules fongiques et l'acheminement aux corps lipidiques seraient dus à des mécanismes actifs impliquant le cytosquelette à l'opposé de l'hypothèse couramment admise d'une diffusion passive.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans une publication soumise à *Environmental Science and Pollution Research* et actuellement en révision mineure (annexe 2).

4. Proposition d'un modèle d'incorporation des HAP par les cellules fongiques

La confrontation des résultats apportés par cette étude avec la littérature permet d'émettre de nouvelles hypothèses quant au mécanisme d'incorporation des HAP chez les champignons filamenteux (figure III 11).

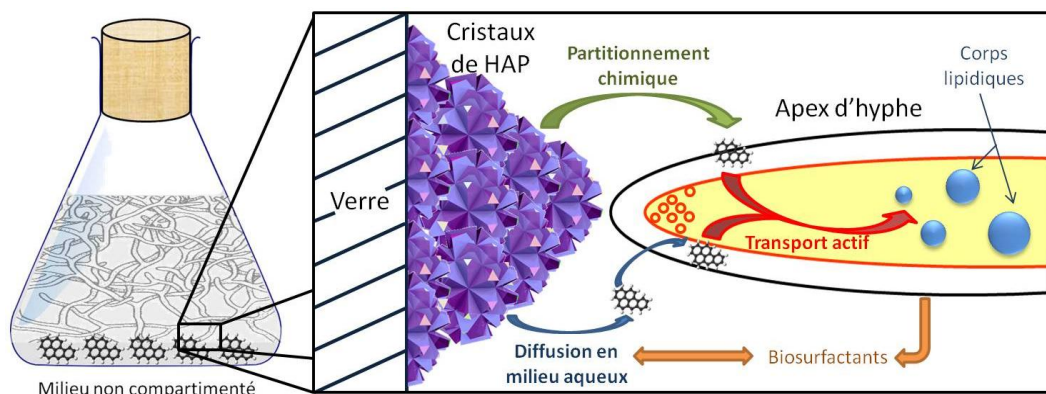


Figure III 11: Schéma récapitulatif des hypothèses résultant de l'étude du mode d'incorporation des HAP chez le champignon filamenteux *Fusarium solani*

Dans notre étude, le dosage des quantités de HAP incorporées par les mycéliums de *F. solani* a montré que le BaP qui présente une solubilité aqueuse inférieure au phénanthrène,

est pourtant plus incorporé dans le cas d'un contact direct entre le mycélium et les cristaux de HAP. Ce résultat va à l'encontre du principe de diffusion passive en milieu aqueux. La situation s'inverse dans le cas d'une compartimentation du milieu de culture, puisque le HAP de faible masse molaire (phénanthrène) est significativement plus incorporé que le BaP dans cette configuration. Le dispositif de compartimentation du milieu permet donc de constater que la solubilité aqueuse des deux HAP modèles ne gouverne leur biodisponibilité que lorsque la source de HAP est séparée spatialement du mycélium. Nous en tirons l'hypothèse qu'un mécanisme supplémentaire à la solubilisation aqueuse intervient dans la biodisponibilité des HAP dans le cas d'un contact direct du mycélium et du dépôt de HAP.

Ce mécanisme pourrait correspondre à un partitionnement chimique des molécules de HAP entre leur forme solide d'origine et des molécules hydrophobes de la surface du mycélium (figure III 11) en accord avec les hypothèses émises par Meissel *et al.* (1973) et Plant *et al.* (1985). En effet dans le cas d'un contact direct du mycélium avec les cristaux de HAP, le phénomène de partitionnement chimique expliquerait l'incorporation favorisée du composé le plus hydrophobe (BaP) du fait de sa plus grande affinité pour un environnement apolaire. La comparaison de la solubilisation de différents HAP par un rhamnolipide d'origine biologique a d'ailleurs montré une meilleure efficacité concernant les molécules les plus hydrophobes (Noordman *et al.*, 2000). De façon concordante, il a déjà été observé que des cellules fongiques utilisant un substrat hydrophobe comme source de carbone présentent une plus grande hydrophobie de surface (Coimbra *et al.*, 2009). Les cellules fongiques seraient ainsi capables de modifier la composition de leur surface cellulaire et notamment des composants pariétaux afin d'avoir accès à des composés hydrophobes par partitionnement chimique comme cela est déjà connu chez les bactéries (Prabhu et Phale, 2003). Ce phénomène a en effet été étudié chez certaines levures en lien avec la dégradation d'hydrocarbures (Coimbra *et al.*, 2009). De plus, il a déjà été décrit que les espèces de levure les plus efficaces dans la dégradation des hydrocarbures présentent une plus grande adhérence cellulaire à ces substances (Miura *et al.*, 1977) liée à une plus grande hydrophobie des surfaces cellulaires (Coimbra *et al.*, 2009 ; Deng *et al.*, 2010). Une souche de la même espèce que notre modèle d'étude *F. solani* a également été montrée présenter une augmentation de l'hydrophobie des surfaces cellulaires en présence de substrats hydrophobes (Vergara-Fernández *et al.*, 2006).

Un changement de structure pariétale a été observé accompagner le processus d'augmentation d'hydrophobie cellulaire chez *Candida tropicalis* lors de l'incorporation

d'acide oléique (Meissel *et al.*, 1973) et d'hydrocarbures (Käppeli *et al.*, 1984). Ce phénomène est même décrit comme menant à l'apparition de canaux transpariétaux en présence d'alcanes chez les levures (Meissel *et al.*, 1973 ; Tanaka et Fukui, 1989) mais aussi chez le champignon filamenteux *Beauveria bassiana* (Juárez *et al.*, 2004). Une augmentation de la rugosité des surfaces pariétales a été montrée en microscopie à force atomique lors de l'exposition au BaP d'une souche filamenteuse du genre *Aspergillus* efficace dans la dégradation de cet HAP (Wu *et al.*, 2009). Du point de vue biochimique, la sorption du phénanthrène par les cellules d'un champignon filamenteux marin (souche non identifiée) efficace dans la dégradation de la lignine est décrite pour être causée par des substances exopolymériques de nature polysaccharidique (Raghukumar *et al.*, 2006). Des études complémentaires sont ainsi nécessaires pour comprendre le rôle du partitionnement chimique dans l'incorporation des HAP par les champignons filamenteux et l'influence active que la cellule fongique peut avoir sur ce processus.

Les études de co-marquages par le BaP et des fluorochromes spécifiques de différents compartiments cellulaires permettent de conclure que cet HAP est stocké dans les corps lipidiques au sein des cellules fongiques de façon concordante à la littérature (Rafin *et al.*, 2000 ; Verdin *et al.*, 2005 a ; Wu *et al.*, 2009 ; Thion *et al.*, 2012). La nature du compartiment de stockage intracellulaire ne semble pas spécifique à *F. solani* puisque le même type de marquage a été observé chez différents genres de champignons filamenteux (Verdin *et al.*, 2005 a ; Wu *et al.*, 2009). Le site de stockage intracellulaire implique une incorporation des molécules de BaP après leur arrivée à la surface des hyphes. Nous montrons dans notre étude par l'utilisation d'azoture de sodium que ce processus d'incorporation résulte d'un transport actif. Cette conclusion est corrélée à l'observation que les zones mycéliennes les plus actives dans l'incorporation du BaP (apex et sites de ramification) sont également les plus actives d'un point de vue métabolique (figure III 9). L'application de la cytochalasine B apporte le complément d'information que ce transport actif est dépendant du réseau d'actine. Le tableau III 2 résume les résultats de notre étude de marquage cellulaire par des fluorochromes.

Tableau III 2: Compartiments cellulaires marqués suite au traitement de *F. solani* par les fluorochromes FM4-64, Bodipy et BaP, et les inhibiteurs NaN₃ et cytochalasine B (* = résultat non montré)

Inhibiteur \ Fluorochrome	FM4-64	Bodipy	BaP
Témoins	Voie endocyttaire	Corps lipidiques	Corps lipidiques
NaN ₃	Membranes plasmiques	Corps lipidiques	Aucun marquage
Cytochalasine B	Membranes plasmiques*	Corps lipidiques	Parois/Membranes plasmiques

Notre hypothèse est que ce transport pourrait s'apparenter au processus d'endocytose ou de pinocytose, bien que l'absence de co-localisation entre le BaP et le FM4-64 indique que cet HAP n'emprunte pas la voie endocyttaire classiquement décrite. Cette hypothèse pourrait également expliquer l'incorporation préférentielle du BaP au niveau des apex et des sites de ramification, puisque le processus d'endocytose a précédemment été corrélé au processus d'exocytose impliqué dans la croissance apicale des hyphes (Fischer-Parton *et al.*, 2000 ; Torralba et Health, 2002). Le marquage par le FM4-64 survient d'ailleurs initialement au niveau de ces parties d'hyphes dans le cadre de notre étude. Ce résultat est en adéquation avec la coloration des cellules apicales par le FM4-64 observée lors de la germination des conidies de *Magnaporthe grisea* (Atkinson *et al.*, 2002). Avec le temps, une extension des marquages du FM4-64 et du BaP des zones les plus métaboliquement actives vers le reste des hyphes est observée. Concernant le BaP, cette propagation pourrait s'expliquer par le concept d'hyphes "pipelines". Ce concept a été introduit suite à l'observation du transport actif de corps lipidiques contenant des HAP le long des réseaux mycéliens de *Pythium ultimum* (Furuno *et al.*, 2012 ; Schamfuß *et al.*, 2013).

L'hypothèse d'un partitionnement chimique des HAP jusqu'aux surfaces cellulaires suivi d'un transport actif vers le compartiment intracellulaire est en parfait accord avec le modèle proposé par Lindley et Heydeman (1986 b) pour expliquer l'incorporation du dodécane par *Cladosporium resinae*. L'étude cinétique de l'incorporation du BaP par *F. solani* (figure III 9) a montré qu'il s'agit d'un processus relativement rapide impliquant sûrement un mécanisme constitutif non spécifique du BaP. Le modèle d'incorporation proposé dans notre étude (figure III 11) pourrait ainsi être commun à différents composés hydrophobes.

Il est intéressant de noter une différence entre les marquages entraînés par le BaP en présence d'azote de sodium et de cytochalasine B (figure III 12).

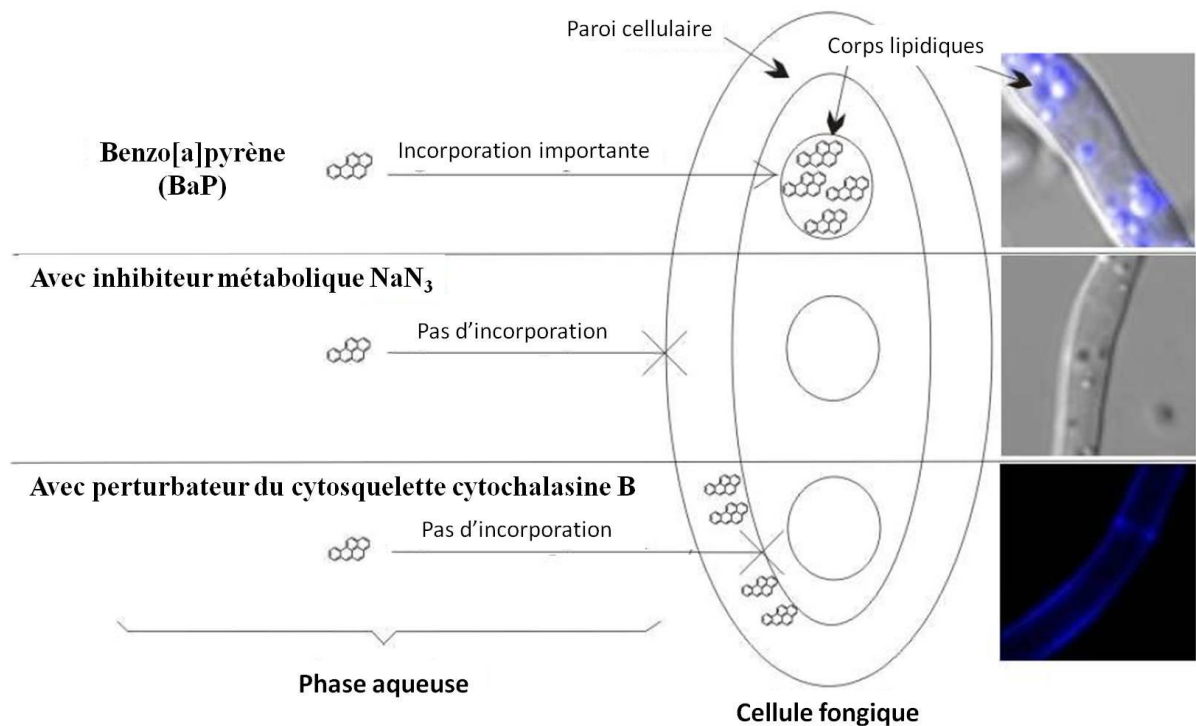


Figure III 12: Schéma récapitulatif des conséquences de l'application d'un inhibiteur métabolique (NaN_3) et d'un perturbateur du cytosquelette (cytochalasine B) sur la localisation cellulaire du BaP chez *F. solani*

En effet si le traitement à l'azoture de sodium résulte en une absence totale de marquage cellulaire, l'exposition à la cytochalasine B entraîne une coloration bleue au niveau pariétal ou membranaire. Cette concentration du marquage au niveau des limites cellulaires est similaire à celle obtenue pour le FM4-64 en présence d'azoture de sodium (figure III 7 e). La concentration du FM4-64 au niveau des membranes plasmiques dans ces conditions est interprétée comme le résultat de sa diffusion passive jusqu'aux cellules et de l'absence d'endocytose empêchant son accès au compartiment intracellulaire. Le fait que l'azoture de sodium bloque le marquage des parois et membranes cellulaires par le BaP observé en présence de cytochalasine B indique qu'à la différence du FM4-64, l'arrivée du BaP jusqu'aux surfaces cellulaires nécessite également une dépense énergétique. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène pourrait être la production de molécules fongiques de nature biosurfactante ou bioémulsifiante augmentant la solubilité aqueuse apparente du BaP (figure III 11). De telles molécules semblent en effet nécessaires d'après des études en calorimétrie qui montrent que des HAP de différentes masses molaires dont le BaP sont pratiquement incapables de franchir la phase aqueuse pour rejoindre des biomembranes (Castelli *et al.*, 2002), ce qui est également le cas pour des nitro-HAP (Castelli *et al.*, 2008). Le mycélium agirait ainsi activement non seulement au niveau de l'incorporation des HAP, mais aussi en amont au niveau de leur biodisponibilité en phase aqueuse. L'hypothèse de la biosynthèse de

molécules extracellulaires à activité biosurfactante augmentant la solubilisation du BaP et son transfert aux cellules fongiques avant l'incorporation du polluant au travers des parois et membranes a déjà été émise (Veignie *et al.*, 2012).

Conclusion partielle

L'étude des champignons filamenteux pour des applications en bioremédiation révèle leur potentiel en particulier pour des contaminants dont la biodisponibilité limite l'accès aux microorganismes compétents dans leur dégradation (chapitre II). Dans ce travail, nous mettons en évidence qu'un transport actif requérant de l'énergie est impliqué dans l'incorporation du BaP au sein des hyphes du Deutéromycète tellurique *Fusarium solani*. Ce mécanisme pourrait être de type endocyttaire et être précédé de processus biochimiques augmentant la solubilité apparente du BaP en phase aqueuse. Des études supplémentaires sont cependant nécessaires pour caractériser le mécanisme moléculaire du transport transmembranaire de cet HAP et son éventuelle ubiquité dans le règne fongique.

La compréhension de ce mécanisme d'incorporation est importante dans la perspective du développement de protocoles de bioremédiation fongique des HAP en sol. En effet, l'hypothèse d'une diffusion passive de la fraction du BaP soluble dans l'eau au travers des membranes plasmiques pour expliquer l'incorporation de cette molécule limite considérablement la quantité de contaminant susceptible d'accéder aux sites de dégradation intracellulaires. Au contraire, un transport actif tel que celui proposé dans cette étude pourrait être une piste prometteuse afin d'améliorer la bioremédiation fongique de polluants organiques. Un transport actif permet d'incorporer de plus grandes quantités de contaminant, car la dépense énergétique utilisée par ce mécanisme permet d'accumuler des molécules y compris à l'encontre de leur gradient de concentration de part et d'autre d'une membrane. Cela a d'ailleurs été le cas dans cette étude avec 82,9% de la quantité initiale de BaP incorporée après 48 h. Ce type de mécanisme pourrait également permettre d'influer sur les conditions environnementales afin d'augmenter les quantités de polluant incorporées dans les cellules y compris pour des composés présentant une faible solubilité aqueuse. Comme cela a été vu dans le chapitre II, des études complémentaires en sol sont nécessaires pour atteindre cet objectif.

Après incorporation des contaminants, les mycéliums sont susceptibles de favoriser leur transport intracellulaire le long du réseau dense des hyphes soit vers leurs propres sites de

dégradation pour les espèces fongiques compétentes dans la dégradation du composé considéré soit vers d'autres microorganismes indigènes compétents. Ce phénomène correspond au concept d'hyphes "pipelines" introduit suite à la découverte du transport actif de vésicules lipidiques contenant du fluorène ou du phénanthrène le long des hyphes de *Pythium ultimum* (Furuno *et al.*, 2012 ; Schamfuß *et al.*, 2013). A la différence de ce que montre notre étude, le concept d'hyphes "pipelines" suppose que les HAP accèdent par diffusion passive jusqu'aux corps lipidiques avant d'être transportés activement avec ces organites. Nos résultats pourraient ainsi compléter ce concept en indiquant l'implication de processus actifs en amont, dans l'incorporation et le transport des HAP vers les corps lipidiques.

La possibilité d'interactions synergiques avec d'autres microorganismes du sol est également vraie avant l'incorporation des contaminants par la production de tensioactifs biologiques qui peuvent augmenter la biodisponibilité de molécules hydrophobes pour des organismes compétents dans leur dégradation (chapitre II). La caractérisation biochimique de ces tensioactifs pourrait présenter un intérêt pour la bioremédiation de molécules hydrophobes, mais aussi pour la modification des propriétés de surface de nouveaux matériaux comme imperméabilisants ou anti-bactériens (Banat *et al.*, 2010).

La perspective d'une accélération des processus de bioremédiation de substances à faible biodisponibilité au sein des sols est particulièrement intéressante. En effet le maintien sur une longue période de communautés microbiennes efficaces dans la dégradation d'un contaminant est difficile et la durée des traitements est l'un des principaux freins au développement de ces techniques de décontamination par voie biologique (Boopathy, 2000 ; Daverey et Pakshirajan, 2011).

Conclusion générale

Dans un contexte international de prise de conscience des problématiques environnementales et de volonté de reconquête des friches industrielles dans les projets d'urbanisme, ce travail de thèse se focalise sur le développement de techniques de remédiation des sols respectueuses de la biodiversité. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) représentent l'une des principales classes de polluants affectant durablement les sols. En Europe, ils constituent près de 11 % des contaminations. La bioremédiation est une technique de dépollution présentant des avantages économiques et écologiques. Les champignons filamenteux saprotrophes telluriques apparaissent intéressants pour la bioremédiation des HAP du fait de leur diversité métabolique et de leur adaptation à la vie dans les sols. Ainsi notre étude porte à la fois sur des aspects fondamentaux de compréhension du processus de biodégradation des HAP par ces microorganismes et sur des essais en microcosmes de sol au laboratoire s'inscrivant dans le développement de protocoles de bioremédiation.

Tout d'abord, une phase d'échantillonnage a permis de collecter 25 échantillons de sols contaminés issus d'origines géographiques et d'activités industrielles différentes. Une phase de documentation et d'analyses a mené à leur caractérisation d'un point de vue historique, géologique, pédologique, hydrique et de leurs contaminations en HAP. Certains de ces échantillons ont ensuite été utilisés pour la constitution d'une mycothèque. Les souches fongiques ont été isolées par deux types de technique permettant d'avoir accès aux souches métaboliquement actives d'une part et aux souches majoritairement sporulantes d'autre part. Un total de 50 souches a ainsi pu être isolé. Parmi elles, 30 souches ont été sélectionnées pour la suite des expérimentations et caractérisées d'un point de vue morphologique. 14 de ces souches ont également été identifiées génétiquement.

Ensuite les capacités de désorption et de dégradation du Benzo[a]pyrène (BaP), un HAP de haute masse molaire, ont été étudiées chez les souches de la mycothèque en milieu minéral. Des corrélations ont alors été recherchées entre les capacités de dégradation du BaP et des activités enzymatiques choisies d'après la littérature pour leur implication dans la dégradation des HAP ou dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Il a ainsi été montré que les souches présentant une meilleure efficacité de dégradation du BaP possèdent également des activités extracellulaires de type Mn-péroxydases et Ln-péroxydases plus

élevées. Ce serait ainsi l'une des premières études à mettre en avant ces activités enzymatiques dans le processus de dégradation d'un HAP chez des souches fongiques saprotrophes. L'activité époxydase du cytochrome P450 apparaît quant à elle plutôt corrélée aux souches faiblement efficaces dans la dégradation du BaP, de même que les enzymes du stress oxydant. Seule une souche (*Cladosporium cladosporioides*) semble posséder une activité époxydase du cytochrome P450 corrélée à une dégradation très efficace du BaP. La purification et l'étude structurale de cette enzyme par cristallographie pourraient permettre de comprendre cette meilleure capacité de dégradation des HAP par comparaison avec d'autres enzymes de la famille des cytochromes P450.

La caractérisation de la mycothèque a permis la sélection de 3 souches (*Fusarium solani*, *Talaromyces helicus* et *Cladosporium cladosporioides*) pour des expériences de bioaugmentation/biostimulation en échantillons de sols historiquement contaminés en HAP. Une méthode innovante d'inoculation du sol avec du mycélium installé sur des granules d'argile est expérimentée à cette occasion. *Talaromyces helicus* constitue une souche autochtone de l'un des deux sols utilisés pour ces expérimentations, tandis que *Cladosporium cladosporioides* et *Fusarium solani* sont allochtones. Dans les deux sols considérés, l'inoculation de *Talaromyces helicus* et de *Fusarium solani* a eu un effet stimulateur significatif sur la dégradation des HAP par rapport aux témoins. Ce serait la première fois à notre connaissance que les capacités de dégradation des HAP de *Talaromyces helicus* sont mises en évidence pour la bioremédiation des sols. A l'opposé, l'inoculation de *Cladosporium cladosporioides* n'a pas eu d'effets significatifs sur la dégradation des HAP, ce qui pourrait être lié à une inhibition du développement de cette souche par les contaminations des échantillons de sol. Les approches de biostimulation par aération ou par ajout de sources d'azote et de phosphate avec ou sans carbone ont eu des conséquences négatives sur l'effet de l'inoculation de *Talaromyces helicus* sur la dégradation des HAP dans son sol d'origine. Afin d'avoir des éléments de réponse sur l'efficacité plus ou moins grande des différentes souches testées et sur l'impact négatif de l'approche de biostimulation utilisée, cette étude sera complétée d'un suivi des populations fongiques par des techniques de biologie moléculaire.

Enfin le processus d'incorporation du BaP a été étudié chez *Fusarium solani* par des observations en microscopie. L'utilisation de marqueurs fluorescents a permis de localiser et de confirmer le stockage intracellulaire du BaP au niveau des corps lipidiques. Nous avons démontré par l'exposition à des inhibiteurs qu'en amont du stockage intracellulaire du BaP, un transport actif de la molécule requérant le réseau d'actine du cytosquelette est impliqué

dans son incorporation. Ces expériences remettent en cause le processus de diffusion passive généralement admis pour expliquer le phénomène d'incorporation des HAP par les cellules fongiques. De plus, la comparaison des quantités incorporées de deux HAP de solubilités aqueuses différentes mis au contact ou séparés spatialement du mycélium a permis d'émettre des hypothèses quant à l'influence fongique sur leur biodisponibilité. Des composés hydrophobes présents en surface du mycélium pourraient en effet influencer sur la biodisponibilité des HAP par partitionnement chimique. Ces nouvelles hypothèses sur l'implication de mécanismes actifs à différents stades du processus d'incorporation des HAP par les cellules fongiques pourraient avoir un impact significatif sur les protocoles de bioremédiation fongique si elles sont vérifiées en sol.

Les approches développées dans ce travail de thèse doctorale ouvrent des perspectives au niveau de la recherche fondamentale et des sciences appliquées. Des études en milieu minéral sont en effet requises à la compréhension des mécanismes impliqués dans le processus de dépollution avant le passage en sol:

- ❖ Désorption des HAP: La purification de tensioactifs biologiques impliqués dans le processus d'augmentation de la biodisponibilité des HAP pourrait permettre leur caractérisation biochimique et leur utilisation dans des protocoles de biostimulation. L'étude de la littérature montre que les cellules fongiques semblent également capables d'augmenter leur hydrophobie de surface pour accéder aux substrats hydrophobes par partitionnement chimique. L'identification des tensioactifs biologiques pourrait permettre d'étudier leur implication dans ce phénomène.
- ❖ Incorporation des HAP: Des expériences d'immunodétection avec des anticorps spécifiques du BaP pourraient amener à visualiser la voie d'incorporation des HAP jusqu'aux corps lipidiques en particulier au niveau de la paroi fongique. La caractérisation de la voie d'incorporation correspondante d'un point de vue moléculaire pourrait ensuite être réalisée par des études de bioinformatique, de génétique et de protéomique. La répartition de ce mécanisme au sein du règne fongique pourrait enfin être étudiée par des alignements de séquences génomiques.
- ❖ Dégradation des HAP: Des approches de génomique comparative et de protéomique pourraient permettre de mieux comprendre les voies de dégradation des HAP chez les champignons saprotrophes. En effet des alignements génomiques avec des

Basidiomycètes lignolytiques peuvent être réalisés pour rechercher la présence de gènes d'enzymes extracellulaires de type Ln POX, Mn POX ou laccase chez les Ascomycètes saprotrophes. D'autre part, l'analyse du taux d'oxydation des protéines fongiques en présence et en absence de BaP par western blot pourrait permettre de corréler les phénomènes de stress oxydant à la dégradation de cet HAP et de mettre en évidence l'implication d'enzymes productrices d'ERO. Les enzymes identifiées dans les voies de dégradation des HAP pourraient par la suite être purifiées et directement utilisées sous une forme immobilisée dans des protocoles de dépollution.

- ❖ Biodégradation des HAP en sol: Des mesures de solubilité apparente des HAP dans la phase aqueuse des sols sont programmées à court terme afin de vérifier l'influence de l'inoculation de souches fongiques sur la biodisponibilité des HAP dans notre étude en microcosmes. Le suivi des populations fongiques par des techniques de biologie moléculaire est également prévu dans la suite de cette étude afin de corréler l'installation des souches inoculées aux modifications en matière d'augmentation de la biodisponibilité et de biodégradation des HAP.
- ❖ Protocole de bioremédiation: Notre étude a montré que l'inoculation de souches fongiques à partir de mycélium établi sur des granules d'argile est intéressante pour des approches de bioaugmentation en sol. Ce protocole d'inoculation offre en effet la possibilité de travailler avec des inocula quantifiables y compris pour des souches non sporulantes qui peuvent également se montrer efficaces dans la dégradation des contaminants. Si l'approche de bioaugmentation a donné des résultats encourageants dans nos expériences en microcosmes, les approches de biostimulation testées ont eu des répercussions nulles ou négatives sur la dégradation des HAP. Des études complémentaires avec différents types de substrats sont à mener afin de voir si l'apport de sources de nutriments plus complexes et plus proches des substrats naturels des champignons saprotrophes ne peut pas stimuler leurs capacités de dégradation des HAP. Concernant l'augmentation de l'aération des sols, des études sont à mener pour comprendre l'impact du procédé d'homogénéisation du sol sur l'organisation du réseau mycélien et sur le métabolisme fongique. Des étapes progressives d'augmentation d'échelle restent encore à mener pour passer des expériences de laboratoire réalisées dans ce travail de thèse à un protocole de bioremédiation applicable *in situ*. Une synergie entre les différents acteurs (scientifiques, bureaux d'étude, professionnels de dépollution, maîtres d'ouvrage, maîtres d'œuvre, collectivités...) est ainsi nécessaire au

développement de nouvelles méthodes de traitement des sols par des tests pilotes à grande échelle sur des sites de démonstration.

Ce projet binational de thèse en cotutelle entre l'ULCO (France) et la TUM (Allemagne) a permis la mise en place d'une collaboration scientifique entre ces deux universités. Cette expérience professionnelle m'a également donné l'occasion de poursuivre ma formation scientifique trilingue dans la continuité de mon diplôme d'ingénieur ESBS (annexe 3).

Références

- ABo - Aktionsplattform Bodenschutz (2012). Flächenverbrauch stoppen - Böden wirksam schützen. Communiqué de presse.
- Acevedo, F.; Pizzul, L.; Castillo, M. d. P.; Cuevas, R. and Diez, M. C. (2011). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracoophyllum discolor*. *Journal of Hazardous Materials* **185**(1): 212-219.
- ADEME (2012). Taux d'utilisation et coûts des différentes techniques et filières de traitement des sols et des eaux souterraines pollués en France. Etude réalisée pour le compte de l'ADEME par Ernst & Young.
- ADEME (2013). Site internet <http://www2.ademe.fr/servlet/list?catid=12735> consulté le 21/10/2013.
- AFES (1995). Annexe 1 : Typologie des formes d'humus. In : Baize, D. et Girard, M.C. (coord.). *Référentiel Pédologique*, INRA Editions, Paris, France.
- Alcalde, M.; Farinas, E. T. and Arnold, F. H. (2004). Colorimetric High-Throughput Assay for Alkene Epoxidation Catalyzed by Cytochrome P450 BM-3 Variant 139-3. *Journal of Biomolecular Screening* **9**(2): 141-146.
- Al-Turki, A. I. (2009). Microbial Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Degradation in Soil. *Research Journal of Environmental Toxicology* **3**(1): 1-8.
- Angelova, M. B.; Pashova, S. B.; Spasova, B. K.; Vassilev, S. V. and Slokoska, L. S. (2005). Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycological Research* **109**(2): 150-158.
- Antoine, P. (2002). Les lœss en France et dans le Nord-Ouest européen. *Revue Française de Géotechnique* **99**: 3-21.
- Archibald, F. S. (1992). A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(9): 3110-3116.
- Arenz, B. E. and Blanchette, R. A. (2011). Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. *Soil Biology and Biochemistry* **43**(2): 308-315.
- Atagana, H.; Haynes, R. and Wallis, F. (2006). Fungal bioremediation of creosote-contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. *Water, Air, & Soil Pollution* **172**(1): 201-219.
- Atkinson, H. A.; Daniels, A. and Read, N. D. (2002). Live-cell imaging of endocytosis during conidial germination in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology* **37**: 233-244.

- Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews* **45**(1): 180-209.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. (1995). Toxicological profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Atlanta, GA, United States of America.
- Balba, M. T.; Al-Awadhi, N. and Al-Daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods* **32**(2): 155-164.
- Baldrian, P. (2008). Wood-inhabiting ligninolytic Basidiomycetes in soils: Ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecology* **1**(1): 4-12.
- Banat, I. M. (1995). Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal – State of the art (review). *Acta Biotechnologica* **15**: 251-267.
- Banat, I.; Franzetti, A.; Gandolfi, I.; Bestetti, G.; Martinotti, M.; Fracchia, L.; Smyth, T. and Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**(2): 427-444.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi (4th edition). APS Press, St Paul, United States of America.
- Barr, D. J. S. (1992). Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. *Mycologia* **84**: 1-11.
- Basrai, M. A.; Naider, F. and Becker, J. M. (1990). Internalization of lucifer yellow in *Candida albicans* by fluid phase endocytosis. *Journal of General Microbiology* **136**: 1059-1065.
- BDAT - Base de Données Analyses de Terres (2013). Outil développé par l'INRA dans le cadre du GISSOL <http://bdat.gissol.fr/geosol/index.php> consulté le 21/10/2013.
- Beauchamps, C. and Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**: 276-287.
- Bennett, J. W.; Wunch, K. G. and Faison, B. D. (2002). Use of fungi biodegradation. In: Hurst, C.J. (ed.). *Manual of Environmental Microbiology, Second Edition*, ASM Press, Washington, United States of America: 960-971.
- Bensch, K.; Braun, U.; Groenewald, J. Z. and Crous, P. W. (2012). The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology* **72**(1): 1-401.
- Bento, F. M.; Camargo, F. A. O.; Okeke, B. C. and Frankenberger, W. T. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology* **96**(9): 1049-1055.
- Bills, G. F.; Christensen, M.; Powell, M. and Thorn, G. (2004). Saprobic soil fungi. In: Mueller, G. M.; Bills, G. F. and Foster, M. S. (eds.). *Biodiversity of fungi: Inventory, Monitoring and Methods*, Elsevier Academic Press, Oxford, United Kingdom: 271-302.

- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* **98**(3): 426-438.
- Blackwell, M. and Spatafora, J. W. (2004). Fungi and their allies. In: Mueller, G. M.; Bills, G. F. and Foster, M. S. (eds.). *Biodiversity of fungi: Inventory, Monitoring and Methods*, Elsevier Academic Press, Oxford, United Kingdom: 7-21.
- BMU - Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (2013). Dritter Bodenschutzbericht der Bundesregierung.
- Bogan, B. W. and Trbovic, V. (2003). Effect of sequestration on PAH degradability with Fenton's reagent: roles of total organic carbon, humin and soil porosity. *Journal of Hazardous Materials* **100**: 285-300.
- Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* **74**(1): 63-67.
- Borràs, E.; Caminal, G.; Sarrà, M. and Novotný, C. (2010). Effect of soil bacteria on the ability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by *Trametes versicolor* and *Irpex lacteus* from contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry* **42**(12): 2087-2093.
- Bosma, T. N. P.; Middeldorp, P. J. M.; Schraa, G. and Zehnder, A. J. B. (1997). Mass transfer limitation of biotransformations: quantifying bioavailability. *Environmental Science and Technology* **31**: 248-252.
- Bossert, I. D. and Bartha, R. (1986) Structure biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **37**: 490-495.
- Bot, A. and Benites, J. (2005). The importance of soil organic matter, Key to drought-resistant soil and sustained food production. *FAO Soils Bulletin* **80**, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Bourett, T. M.; James, S. W. and Howard, R. J. (2006). The endomembrane system of the fungal cell. In: Howard, R. J.; Gow, N. A. R. and Esser K. (eds.). *Biology of the fungal cell* (2nd edition), *The Mycota* vol. **8**, Springer-Verlag, Berlin, Germany: 1-47.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**(1-2): 248-254.
- BRGM (2013). Outil Infoterre <http://infoterre.brgm.fr/> consulté le 21/10/2013.
- Brussaard, L.; de Ruiter, P. C. and Brown, G. G. (2007). Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **121**, 233-244.
- Camargo-de-Morais, M. M.; Ramos, S. A. F.; Pimentel, M. C. B.; De Morais Jr, M. A. and Lima, J. L. (2003). Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **19**: 191-194.

- Castelli, F.; Librando, V. and Sarpietro, M. G. (2002). Calorimetric Approach of the Interaction and Absorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Model Membranes. *Environmental Science & Technology* **36**(12): 2717-2723.
- Castelli, F.; Micieli, D.; Ottimo, S.; Minniti, Z.; Sarpietro, M. G. and Librando, V. (2008). Absorption of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons by biomembrane models: Effect of the medium lipophilicity. *Chemosphere* **73**(7): 1108-1114.
- Cavalieri, E. L. and Rogan, E. G. (1985). Role of radical cations in aromatic hydrocarbon carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* **64**: 69-84.
- Cavalieri, E. L. and Rogan, E. G. (1995). Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica* **25**: 677-688.
- Cerniglia, C.E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**: 351-368.
- Cerniglia, C.E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* **4**, 331-338.
- Cerniglia, C. E. (1997). Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **19**: 324-333.
- Chaillan, F.; Le Flèche, A.; Bury, E.; Phantavong, Y. H.; Grimont, P.; Saliot, A. and Oudot, J. (2004). Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology* **155**(7): 587-595.
- Chesters, C. G. C. and Thornton, R. H. (1956). A comparison of techniques for isolating soil fungi. *Transactions of the British Mycological Society* **39**(3): 301-313.
- Chikere, C. B.; Okpokwasili, G. C. and Chikere, B. O. (2011). Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech* **1**(3): 117-138.
- Chung, N. and Alexander, M. (2002). Effect of soil properties on bioavailability and extractability of phenanthrene and atrazine sequestered in soil. *Chemosphere* **48**, 109-115.
- Cirigliano, M. C. and Carman, G. M. (1985). Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* **50**(4): 846-850.
- Coimbra, C. D.; Rufino, R. D.; Luna, J. M. and Sarubbo, L. A. (2009). Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation to the production of biosurfactants for environmental applications. *Current Microbiology* **58** : 245-251.
- Colombo, J. C.; Cabello, M. and Arambarri, A. I. M. (1996). Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolytic fungi. *Environmental Pollution* **94**(3): 355-362.

- Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds (2003). Sodium azide [MAK Value Documentation, 2003]. In: The MAK-Collection for Occupational Health and Safety, *Occupational Toxicants* series, Vol. **20**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany.
- Cooney, J. J.; Siporin C. and Smucker, R. A. (1980). Physiological and Cytological Responses to Hydrocarbons by the Hydrocarbon-Using Fungus *Cladosporium resinae*. *Botanica Marina* **23**: 227-232.
- Covino, S.; Muzikár, M.; Svobodová, K.; D'annibale, A.; Petruccioli, M.; Federici, F.; Kresinová, Z. and Cajthaml, T. (2010 a). An efficient PAH-degrading *Lentinus (Panus) tigrinus* strain: Effect of inoculum formulation and pollutant bioavailability in solid matrices. *Journal of Hazardous Materials* **183**: 669-676.
- Covino, S.; Svobodová, K.; Cvancarová, M.; D'Annibale, A.; Petruccioli, M.; Federici, F.; Kresinová, Z.; Galli, E. and Cajthaml, T. (2010 b). Inoculum carrier and contaminant bioavailability affect fungal degradation performances of PAH-contaminated solid matrices from a wood preservation plant. *Chemosphere* **79**(8): 855-864.
- Covino, S.; Svobodová, K.; D'Annibale, A.; Cvancarová, M.; Petruccioli, M. and Federici, F. (2010 c). Effect of inoculum formulation and contaminant bioavailability on PAH degradation performances of *Lentinus tigrinus* on contaminated solid matrices. *Journal of Biotechnology* **150**(Supplement 1): 225-225.
- CPCS - Commission de Pédologie et de Cartographie des Sols (1967). Classification des sols.
- Cultrone, A.; Scazzocchio, C.; Rochet, M.; Montero-Morán, G.; Drevet, C. and Fernández-Martín, R. (2005). Convergent evolution of hydroxylation mechanisms in the fungal kingdom: molybdenum cofactor-independent hydroxylation of xanthine via α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Molecular Microbiology* **57**(1): 276-290.
- da Silva, M.; Cerniglia, C. E., Pothuluri, J. V.; Canhos, V. P. and Esposito, E. (2003). Screening filamentous fungi isolated from estuarine sediments for the ability to oxidize polycyclic aromatic hydrocarbons. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **19**(4): 399-405.
- Daverey, A. and Pakshirajan, K. (2011). Recent advances in bioremediation of contaminated soil and water using microbial surfactants. In: Ahmad, I.; Ahmad, F. and Pichtel, J (eds.). *Microbes and microbial technology*, Springer Science+Business Media LLC, New York, United States of America: 207-228.
- Davies, J. S. and Westlake, D. W. S. (1979). Crude oil utilization by fungi. *Canadian Journal of Microbiology* **25**(2): 146-156.
- de Hoog, G. S.; Marvin-Sikkema, F. D.; Lahpoor, G. A. ; Gottschall, J. C.; Prins, R. A. and Guého, E. (1994). Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Mycoses* **37**: 71-78.

- De Kreuk, J.F. (2005). Advantages of in-situ remediation of polluted soil and practical problems encountered during its performance. *Nato Science Series: IV: Earth and Environmental Sciences* **52**, 257-265.
- Deacon, L. J.; Janie Pryce-Miller, E.; Frankland, J. C.; Bainbridge, B. W.; Moore, P. D. and Robinson, C. H. (2006). Diversity and function of decomposer fungi from a grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry* **38**(1): 7-20.
- Deng, Y.; Zhang, Y.; El-Latif Hesham, A.; Liu, R. and Yang, M. (2010). Cell surface properties of five polycyclic aromatic compound-degrading yeast strains. *Applied Microbiology Biotechnology* **86**: 1933–1939.
- Desai, J. D. and Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**(1):47-64.
- Deutsch, J. (1983). Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. In: Bergmeyer, H.U.; Bergmeyer, J. and GraBl, M. (eds.). *Methods of Enzymatic Analysis Third Edition Volume III Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany: 190-197.
- Dixon, P. D.; Cole, D. J. and Edwards, R. (1998). Purification, regulation and cloning of a glutathione transferase (GST) from maize resembling the auxin-inducible type-III GSTs. *Plant Molecular Biology* **36**: 75-87.
- Duchaufour, P. (1988). La fraction organique. In: *Pédologie* (2^e édition), Masson, Paris, France : 33-49.
- Dunford, H. B. and Stillman, J. S. (1976). On the function and mechanism of action of peroxidases. *Coordination Chemistry Reviews* **19**: 187-251.
- Durán, N. and Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental* **28**(2): 83-99.
- Dzul-Puc, J. D.; Esparza-García, F.; Barajas-Aceves, M. and Rodríguez-Vázquez, R. (2005). Benzo[a]pyrene removal from soil by *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse and pine sawdust. *Chemosphere* **58**(1): 1-7.
- Eggen, T. and Majcherczyk, A. (1998). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **41**(2): 111-117.
- Ekelund, F.; Rønn, R. and Christensen, S. (2001). Distribution with depth of protozoa, bacteria and fungi in soil profiles from three Danish forest sites. *Soil Biology and Biochemistry* **33**(4-5): 475-481.
- Falcón, M. A.; Rodriguez, A.; Carnicero, A.; Regalado, V.; Perestelo, F.; Milstein, O. and De La Fuente, G. (1995). Isolation of microorganisms with lignin transformation potential from soil of Tenerife Island. *Soil Biology and Biochemistry* **27**(2): 121-126.

- Ferguson, B. A.; Dreisbach, T. A.; Parks, C. G.; Filip, G. M. and Schmitt, C. L. (2003). Coarse-scale population structure of pathogenic *Armillaria* species in a mixed-conifer forest in the Blue Mountains of northeast Oregon. *Canadian Journal of Forest Research* **33**(4): 612-623.
- Fischer-Parton, S.; Parton, R. M.; Hickey, P. C.; Dijksterhuis, J.; Atkinson, H. A. and Read, N. D. (2000). Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *Journal of Microscopy* **198**: 246-259.
- Furuno, S.; Foss S.; Wild, E.; Jones, K. C.; Semple, K. T.; Harms, H.; Lukas Y. and Wick, L. Y. (2012). Mycelia promote active transport and spatial dispersion of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Science & Technology* **46**: 5463-5470.
- Gadd, G. M. (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research* **111**: 3-49.
- Garon, D.; Sage, L. and Seigle-Murandi, F. o. (2004). Effects of fungal bioaugmentation and cyclodextrin amendment on fluorene degradation in soil slurry. *Biodegradation* **15**(1): 1-8.
- Garrett, S. D. (1951). Ecological groups of soil fungi: a survey of substrate relationships. *New Phytologist* **50**(2): 149-166.
- Gautam, K. K. and Tyagi, V. K. (2006). Microbial surfactants: A Review. *Journal of Oleo Science* **55**(4): 155-166.
- Gauthier, T. D.; Seitz, W. R. and Grant, C. L. (1987). Effects of structural and compositional variations of dissolved humic materials on pyrene K_{oc} values. *Environmental Science and Technology* **21**: 243-348.
- Gianfreda, L. and Rao, M. A. (2004). Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and Microbial Technology* **35**(4): 339-354.
- Giger, W. and Blumer, M. (1974). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment. Isolation and characterization by chromatography, visible, ultraviolet, and mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **46**, 1663–1671.
- Giraud, F.; Guiraud, P.; Kadri, M.; Blake, G. and Steiman, R. (2001). Biodegradation of anthracene and fluoranthene by fungi isolated from an experimental constructed wetland for wastewater treatment. *Water Research* **35**(17): 4126-4136.
- GIS3SP (2013). Site internet <http://www.gis3sp.fr> consulté le 21/10/2013.
- Gocze, P. M. and Freeman, D. A. (1994). Factors underlying the variability of lipid droplet fluorescence in MA-10 leydig tumor cells. *Cytometry* **17**: 151-158.
- Golueke, C. G. (1981). Principles of biological resources recovery. *Biocycle* **22**: 36-40.

- Gow, N. A. R. (1995). Tip growth and polarity. In: Gow, N. A. R. and Gadd, G. M. (eds.). *The growing fungus*, Chapman & Hall, London, United Kingdom: 277-299.
- Gramss, G.; Kirsche, B.; Voigt, K. D.; Günther, T. and Fritsche, W. (1999). Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes. *Mycological Research* **103**(8): 1009-1018.
- Griffin, D. M. (1969). Soil water in the ecology of fungi. *Annual Review of Phytopathology* **7**: 289-310.
- Grundmann, S.; Fuß, R.; Schmid, M.; Laschinger, M.; Ruth, B.; Schulin, R.; Munch, J. C. and Schroll, R. (2007). Application of microbial hot spots enhances pesticide degradation in soils. *Chemosphere* **68**(3): 511-517.
- Guarro, J.; Kantarcioglu, A. S.; Horr , R.; Rodriguez-Tudela, J. L.; Estrella, M. C.; Berenguer, J. and de Hoog, G. S. (2006). *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Medical Mycology* **44**(4): 295-327.
- Guiraud, P.; Villemain, D.; Kadri, M.; Bordjiba, O. and Steiman, R. (2003). Biodegradation capability of *Absidia fusca* Linnemann towards environmental pollutants. *Chemosphere* **52**(4): 663-671.
- Hadibarata, T. (2009). Oxidative Degradation of Benzo[a]pyrene by the Ligninolytic Fungi. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry - Environmental Research in Asia*: 309-316.
- Haritash, A. K. and Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials* **169**(1-3): 1-15.
- Harris, E. D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *The FASEB Journal* **6**(9): 2675-2683.
- Hartge, K. H. and Horn, R. (1989). Die physikalische Untersuchung von B den (2nd ed.). Enke, F. (ed.), Stuttgart, Germany.
- Harwood, C. S. and Gibson, J. (1986). Uptake of benzoate by *Rhodospseudomonas palustris* grown anaerobically in light. *Journal of Bacteriology* **171**: 4063-4066.
- Hawksworth, D. L. and Kalin-Arroyo, M. T. (1995). Magnitude and distribution of biodiversity. In: *Global Biodiversity Assessment*. Heywood, V.H. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom: 107-191.
- Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* **105**: 1422-1432.
- Hawksworth, D. L. and Mound, L. A. (1991). Biodiversity databases: The crucial significance of collections. *The Biodiversity of Microorganisms and Invertebrates: Its Role in Sustainable Agriculture*. CAB International, Wallingford, 17-31.

- Hearn, E. M.; Patel, D. R. and van den Berg, B. (2008). Outer-membrane transport of aromatic hydrocarbons as a first step in biodegradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 8601-8606.
- Heitkamp, M. A. and Cerniglia, C. E. (1987). The effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater and estuarine ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry* **6**: 535-546.
- Hlavica, P. (2013). Evaluation of structural features in fungal cytochromes P450 predicted to rule catalytic diversification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1834**(1): 205-220.
- Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* **30**(4): 454-466.
- Hölker, U.; Fakoussa, R. M. and Höfer, M. (1995). Growth substrates control the ability of *Fusarium oxysporum* to solubilize low-rank coal. *Applied Microbiology and Biotechnology* **44**(3-4): 351-355.
- Hrycay, E. and O'Brien, P. J. (1971). Cytochrome P-450 as a microsomal peroxidase utilizing a lipid peroxide substrate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **147**: 14-27.
- Hrycay, E. G. and O'Brien, P. J. (1972). Cytochrome P-450 as a microsomal peroxidase in steroid hydroperoxide reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **153**: 480-494.
- Hübner, T. (2002). Eignung verschiedener Pflanzen für die Sanierung von Kontaminationen aus der carbo- und petrolchemischen Industrie. *Thèse doctorale*. Halle University, Germany.
- Hughes, K. A.; Bridge, P. and Clark, M. S. (2007). Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Science of The Total Environment* **372**(2-3): 539-548.
- Hugnet, C.; Marrou, B.; Dally, C. and Guillot, J. (2009). Osteomyelitis and discospondylitis due to *Scedosporium apiospermum* in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **21**(1): 120-123.
- Ifen - Institut Français de l'Environnement (2004). Le sol et le sous-sol. In: Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL). L'environnement en Nord-Pas-de-Calais, *Cahiers Régionaux de l'Environnement*: 61-71.
- INERIS - Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (2006). Benzo[a]pyrène. *Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques*.
- Jacques, R. J. S.; Okeke, B. C.; Bento, F. M.; Peralba, M. C. R. and Camargo, F. A. O. (2007). Characterization of a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degrading Microbial Consortium from a Petrochemical Sludge Landfarming Site. *Bioremediation Journal* **11**(1): 1-11.

- Janusz, G.; Kucharzyk, K. H.; Pawlik, A.; Staszczak, M. and Paszczynski, A. J. (2013). Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme and Microbial Technology* **52**(1): 1-12.
- Johansson, M. (2001). Composition of the saprotrophic fungi in Calluna heathland soil and the influence of ammonium nitrate application. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus* **1**(1): 231-239.
- Johnsen, A. R.; Wick, L. Y. and Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution* **133**(1): 71-84.
- Johnson, M. E.; Berk, D. A.; Blankschtein, D.; Golan, D. E.; Jain, R. K. and Langer, R. S. (1996). Lateral diffusion of small compounds in human stratum corneum and model lipid bilayer systems. *Biophysical Journal* **71**: 2656-2668.
- Jones, W. R. and Wise, D. L. (1997). Biosurfactants, bioavailability and bioremediation. *Studies in Environmental Science* **66**: 379-391.
- Juárez, M. P.; Pedrini, N. and Crespo, R. (2004). Mycoinsecticides against Chagas disease vectors: biochemistry involved in insect host hydrocarbon degradation. In: Mas-Comas, S. (ed.). *Multidisciplinary for Parasites, Vectors and Parasitic Diseases*, Monduzzi Editore, Bologna, Italy: 137-142.
- Juhasz, A. L. (2008). Can bioavailability assays predict the efficacy of PAH bioremediation. In: Naidu, R. (ed.). *Chemical bioavailability in terrestrial environments. Developments in soil science* Volume **32**, Elsevier, Oxford, United Kingdom: 569-587.
- Juhasz, A. L. and Naidu, R. (2000 a). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation* **45**(1-2): 57-88.
- Juhasz, A. L., Megharaj, M. and Naidu, R. (2000 b). Bioavailability: The major challenge (constraint) to bioremediation of organically contaminated soils. In: Wise, D. L.; Trantolo, D. L.; Cichon, E. J.; Inyang, H. I. and Stottmeister, U. (eds.). *Remediation of hazardous waste contaminated soils (2nd edition)*, *Environmental Science and Pollution Control Series* **8**, Marcel Dekker, New York, United States of America: 217-241.
- Jung, H.; Sohn, K.-D.; Neppolian, B. and Choi, H. (2008). Effect of soil organic matter (SOM) and soil texture on the fatality of indigenous microorganisms in intergrated ozonation and biodegradation. *Journal of Hazardous Materials* **150**, 809-817.
- Kamisaka, Y. and Noda, N. (2001). Intracellular Transport of Phosphatidic Acid and Phosphatidylcholine into Lipid Bodies in an Oleaginous Fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispora*. *Journal of Biochemistry* **129**: 19-26.
- Kamisaka, Y.; Noda, N.; Sakai, T.; Kawasaki, K. (1999). Lipid bodies and lipid body formation in an oleaginous fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispora*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids* **1438**: 185-198.

- Käppeli, O.; Walther, P.; Mueller, M. and Fiechter, A. (1984). Structure of the cell surface of the yeast *Candida tropicalis* and its relation to hydrocarbon transport. *Archives of Microbiology* **138**: 279-282.
- Khurana, R.; Uversky, V. N.; Nielsen, L. and Fink, A. L. (2001). Is Congo Red an Amyloid-specific Dye? *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 22715–22721.
- Koerselman, W. and Meuleman, A. F. M. (1996). The vegetation N:P ratio: a new tool to detect the nature of nutrient limitation. *Journal of Applied Ecology* **33**: 1441-1450
- Krumova, E. Z.; S. B. Pashova, P. A. Dolashka-Angelova, T. Stefanova and Angelova, M. B. (2009). Biomarkers of oxidative stress in the fungal strain *Humicola lutea* under copper exposure. *Process Biochemistry* **44**(3): 288-295.
- Laflamme, R. E. and Hites, R. A. (1978). The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **42** (3), 289-303.
- Leahy, J. G. and Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **54**(3): 305-315.
- Lecoeur, S. (1999). L'atelier du chemin de fer de Moulin Neuf: ses 30 glorieuses. Conférence faite au Cercle Généalogique des Cheminots, Paris, France.
- Leitão, A. L. c. (2009). Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **6**(4): 1393-1417.
- Leplat, J. (1965). Exposé présenté aux Journées de la Géologie Appliquée aux problèmes des Ponts et Chaussées, organisées à Rouen les 12, 13, 14 mai 1965 par le Laboratoire Régional de Rouen et le Laboratoire Central des Ponts et Chaussées.
- Levy, G. J. and Shainberg, I. (2005). Sodic Soils. In : Hillel, D. (ed.). *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Elsevier, Oxford, United Kingdom: 504-513.
- Li, X.; Wu, Y.; Lin, X.; Zhang, J. and Zeng, J. (2012). Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil microcosms amended with mushroom cultivation substrate. *Soil Biology and Biochemistry* **47**(0): 191-197.
- Li, Y and Schellhorn, H. E. (2007). Rapid kinetic microassay for catalase activity. *Journal of Biomolecular_Techniques* **18**: 185-187.
- Liang, B.; Lehmann, J.; Solomon, D.; Kinyangi, J.; Grossman, J.; O'Neill, B.; Skjemstad, J. O.; Thies, J.; Luizão, F. J.; Petersen, J. and Neves, E. G. (2006). Black carbon increases Cation Exchange Capacity in soils. *Soil Science Society of America Journal* **70**(5): 1719-1730.
- Librando, V. and Pappalardo, M. (2013). In silico bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon: A frontier in environmental chemistry. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **44**(0): 1-8.
- Lindley, N. D. and Heydeman, M. T. (1983). Uptake of vapour phase [¹⁴C]Dodecane by whole mycelia of *Cladosporium resinae*. *Journal of General Microbiology* **129**: 2301-2305.

- Lindley, N. D. and Heydeman, M. T. (1986 a). The uptake of n-alkanes from alkane mixtures during growth of the hydrocarbon-utilizing fungus *Cladosporium resinae*. *Applied Microbiology Biotechnology* **23**: 384-388.
- Lindley, N. D. and Heydeman, M. T. (1986 b). Mechanism of Dodecane Uptake by Whole Cells of *Cladosporium resinae*. *Journal of General Microbiology* **132**: 751-756.
- Lladó, S.; Covino, S.; Solanas, A. M.; Viñas, M.; Petruccioli, M. and D'annibale, A. (2013). Comparative assessment of bioremediation approaches to highly recalcitrant PAH degradation in a real industrial polluted soil. *Journal of Hazardous Materials* **248-249(0)**: 407-414.
- Löser, C.; Seidel, H.; Hoffmann, P. and Zehnsdorf, A. (1999). Bioavailability of hydrocarbons during microbial remediation of a sandy soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**, 105-111.
- Lotrario, J. B.; Stuart, B. J.; Lam, T.; Arands, R. R.; O'Connor, O. A. and Kosson, D. S. (1995). Effects of sterilization methods on the physical characteristics of soil: Implications for sorption isotherm analyses. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **54** (5): 668-675.
- Lozovaya, V. V., A. V. Lygin, O. V. Zernova, S. Li, J. M. Widholm and G. L. Hartman (2006). Lignin degradation by *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. *Plant Disease* **90(1)**: 77-82.
- Lucas, R.E. and Davis, J.F. (1961). Relationships between pH values of organic soils and availabilities of 12 plant nutrients. *Soil Science* **92(3)**: 177-182.
- Luna-Velasco, M. A.; Esparza-García, F.; Cañizares-Villanueva, R. O. and Rodríguez-Vázquez, R. (2007). Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp.. *Process Biochemistry* **42**: 310-314.
- Lushchak, V. I. (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **153(2)**: 175-190.
- Mahmood, S. K. and Rama Rao, P. (1993). Microbial abundance and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **50**: 486-491.
- Mancera-López, M. E.; Esparza-García, F.; Chávez-Gómez, B.; Rodríguez-Vázquez, R.; Saucedo-Castañeda, G. and Barrera-Cortés, J. (2008). Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* **61(2)**: 151-160.
- Marcoux, J. (2000). Optimization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons degradation in a two-liquid-phase bioreactor. *Journal of Applied Microbiology* **88**:655-662.

- Marnett, L. J.; Weller, P. A. and Battista, J. R. (1986). Comparison of the peroxidase activity of heme proteins and cytochrome P 450. In: Ortiz de Montellano, P. R. (ed.). *Cytochrome P-450*, Plenum Press, New York, United States of America: 29-76.
- Martens, R.; Wolter, M.; Bahadir, M. and Zadrazil, F. (1999). Mineralization of ¹⁴C-labelled highly-condensed polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by *Pleurotus sp.* Florida. *Soil Biology and Biochemistry* **31**(13): 1893-1899.
- Martin, A. and Nolin, M. C. (1991). Description et interprétation des unités cartographiques. *Étude pédologique du comté de Chambly, Québec*. Équipe pédologique du Québec, Agriculture Canada, Sainte-Foy, Québec. Centre de recherches sur les terres et les ressources biologiques, Direction générale de la recherche. *Contribution no 89-26* Vol. **1**.
- Meckenstock, R. U.; Safinowski, M. and Griebler, C. (2004). Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology* **49**(1): 27-36.
- Meissel, M. N.; Medvedeva, G. A.; Kozlova, T. M.; Pomoshnikova, N. A.; Zaikina, A. I. and Fedoseeva, G. E. (1973). Regularities of penetration into yeast cells of higher fatty acids and hydrocarbons, their intracellular migration and concentration. *Proceedings of the third International Specialized Symposium on Yeasts II*: 149-168.
- Mihelcic, J. R. ; Lueking, D. R. ; Mitzell, R. J. and Stapleton, J. M. (1993). Bioavailability of sorbed and separate phase chemicals. *Biodegradation* **4**: 141–153.
- Ministère de l'Écologie, du Développement durable, des Transports et du Logement, Direction Générale de la Protection des Risques, Bureau du Sol et Sous-Sol (2011). Guide de mise en œuvre des restrictions d'usage applicables aux sites et sols pollués.
- Miura, Y.; Okazaki, M.; Hamada, S. I.; Murakawa, S. I. and Yugen, R. (1977). Assimilation of liquid hydrocarbon by microorganisms. I. Mechanism of hydrocarbon uptake. *Biotechnology and bioengineering* **19**(5): 701-714.
- Mohan, P. K.; Nakhla, G. and Yanful, E. K. (2006). Biokinetics of biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. *Water Research* **40**: 533-540.
- Mohn, W. W. (2004). Biotransformation, biodegradation and bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In: Singh, A. and Ward, O. P. (eds.). *Biodegradation and Bioremediation, Soil Biology* Volume **2**, Springer, Berlin, Germany: 83-124.
- Mollea, C., Bosco, F. and Ruggeri B. (2005). Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. *Chemosphere* **60**(5): 636-643.
- Mönkemann, H.; Hölker, U. and Höfer, M. (1997). Components of the ligninolytic system of *Fusarium oxysporum* and *Trichoderma atroviride*. *Fuel Processing technology* **52**: 73-77.
- Mulligan, N. C. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution* **133**: 183-198.

- Munn, A. L. (2001). Molecular requirements for the internalisation step of endocytosis: insights from yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1535**(3): 236-257.
- Muriel, J. M.; Bruque, J. M.; Olias, J. M. and Sanchez-Jimenez, A. (1996). Production of biosurfactants by *Cladosporium resinae*. *Biotechnology Letters* **18**: 235-240.
- Mycobank (2013). www.mycobank.org. Site internet consulté le 07/10/2013.
- Ngo, T. T. and Lenhoff, H. M. (1980). A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions. *Analytical Biochemistry* **105**(1): 389-397.
- NICOLE (Network for Industrially Contaminated Land in Europe) Brownfield Working Group (2011). Environmental liability transfer in Europe: Divestment of contaminated land for brownfield regeneration. Publication technique/Rapport.
- Noordman, W. H.; Bruining, J.-W.; Wietzes, P. and Janssen, D. B. (2000). Facilitated transport of a PAH mixture by a rhamnolipid biosurfactant in porous silica matrices. *Journal of Contaminant Hydrology* **44**(2): 119-140.
- O'Brien, B. L.; Parrent, J. L.; Jackson, J. A.; Moncalvo, J. M. and Vilgalys, R. (2005). Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 5544-5550.
- Oberbremer, A.; Muller-Hurtig, R. and Wagner, F. (1990). Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **32**(4): 485-489.
- Oliver, L.; Ferber, U.; Grimski, D.; Millar, K. and Nathanail P. (2005). The scale and nature of european brownfields. *Concerted Action on Brownfield and Economic Regeneration Network (CABERNET) conference paper*.
- ORB NPdC - Observatoire Régional de la Biodiversité en Nord-Pas-de-Calais (2011). Evolution du nombre de sites pollués. In: *Brochure de synthèse des indicateurs 2011*: 63 - 64.
- ORB NPdC - Observatoire Régional de la Biodiversité en Nord-Pas-de-Calais (2012). Evolution de la biomasse microbienne des sols. In: *Brochure de synthèse des indicateurs 2012*: 25 - 26.
- Oudot, J.; Fusey, P.; Abdelouahid, D. E.; Haloui, S. and Roquebert, M. F. (1987). Capacités dégradatives de bactéries et de champignons isolés d'un sol contaminé par un fuel. *Canadian Journal of Microbiology* **33**: 232-243.
- Panagos, P.; Van Liedekerke, M.; Yigini, Y. and Montanarella, L. (2013). Contaminated sites in Europe: Review of the current situation based on data collected through a european network. *Journal of Environmental and Public Health* **2013**: 11 pages.
- Parales, R. E.; Ju, K.-S.; Rollefson, J. and Ditty, J. L. (2008). Bioavailability, transport and chemotaxis of organic pollutants. In: E. Diaz, (ed.). *Microbial Bioremediation*, Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom: 145-187.

- Paraszkiewicz, K.; Kanwal, A. and Dlugonski, J. (2002). Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *Journal of Biotechnology* **92**(3): 287-294.
- Park, K.; Sims, R. and Dupont, R. (1990 a). Transformation of PAHs in Soil Systems. *Journal of Environmental Engineering* **116**(3): 632-640.
- Park, K. S.; Sims, R. C.; Dupont, R. R.; Doucette, W. J. and Matthews, J. E. (1990 b). Fate of PAH compounds in two soil types: Influence of volatilization, abiotic loss and biological activity. *Environmental Toxicology and Chemistry* **9**(2): 187-195.
- Parrish, Z. D.; Banks, M. K. and Schwab, A. P. (2005). Assessment of contaminant lability during phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon impacted soil. *Environmental Pollution* **137**(2): 187-197.
- Passardi, F.; Bakalovic, N.; Teixeira, F. K.; Margis-Pinheiro, M.; Penel, C. and Dunand, C. (2007). Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics* **89**(5): 567-579.
- Passarini, M. R. Z.; Rodrigues, M. V. N.; da Silva, M. and Sette, L. D. (2011). Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. *Marine Pollution Bulletin* **62**(2): 364-370.
- Patouilliard, N. (1900). Essai taxonomique sur les familles et les genres des hyménomycètes. Lucien Declume, Lons-le-Saunier, France.
- Pelmont, J. (1995). L'attaque de la lignine. In: Presses Universitaires de Grenoble (ed.). *Enzymes : Catalyseurs du monde vivant*, EDP Sciences, Les Ulis, France: 897-903.
- Peñalva, M. Á. (2010). Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Current Opinion in Microbiology* **13**: 684-692.
- Plant, A. L.; Benson, D. M. and Smith, L. C. (1985). Cellular uptake and intracellular localization of benzo(a)pyrene by digital fluorescence imaging microscopy. *The Journal of Cell Biology* **100**: 1295-1308.
- POPSU – Plate-forme d'Observation des Projets et Stratégies Urbaines (2008). Zone de l'Union. Extrait du tome 3 du rapport final: 173-190.
- Pothuluri, J. V. and Cerniglia, C. E. (1998). Current aspects of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation process. In: Sikdar, S.K. and Irvine, R.L. (eds.). *Bioremediation: Principles and practice*, volume **2**, Technomic Publishing Co., Lancaster, United Kingdom: 461-497.
- Potin, O.; Rafin, C. and Veignie, E. (2004 a). Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* **54**(1): 45-52.

- Potin, O.; Veignie, E. and Rafin, C. (2004 b). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology* **51**(1): 71-78.
- Pousset, J. (2002). Les analyses de terre donnent des indications utiles mais limitées. In : *Engrais verts et fertilité des sols* (2^e édition). Editions Agridécisions, Paris, France: 49-65.
- Prabhu, Y. and Phale, P. S. (2003). Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas sp.* strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**(4): 342-351.
- Pritsch, K.; Raidl, S.; Marksteiner, E.; Blaschke, H.; Agerer, R.; Schloter M. and Hartmann, A. (2004). A rapid and highly sensitive method for measuring enzyme activities in single mycorrhizal tips using 4-methylumbelliferone-labelled fluorogenic substrates in a microplate system. *Journal of Microbiological Methods* **58**(2): 233-241.
- Rafin, C.; Foucault, B. and Veignie, E. (2013). Exploring micromycetes biodiversity for screening benzo[a]pyrene degrading potential. *Environmental Science and Pollution Research* **20**(5): 3280-3289.
- Rafin, C.; Potin, O.; Veignie, E.; Lounes-Hadj Sahraoui, A. and Sancholle, M. (2000). Degradation of benzo[a]pyrene as sole carbon source by a non white rot fungus, *Fusarium solani*. *Polycyclic Aromatic Compounds* **21**, 311-329.
- Rafin, C.; Veignie, E.; Woisel, P. and Cazier, F. (2004). Intérêt des champignons telluriques dans des processus de bioremédiation des sols pollués par des hydrocarbures aromatiques polycycliques. *Déchets* **33**, 7-11.
- Rafin, C.; Veignie, E.; Woisel, P.; Cazier, F. and Surpateanu, G. (2006). New potential of a Deuteromycete fungus *Fusarium solani* in benzo[a]pyrene degradation: an eco-physiological hypothesis? *New frontiers in environmental research*. Nova Science Publishers, Inc.; New York: 165-179.
- Raghukumar, C.; Shailaja, M.S.; Parameswaran, P.S. and Singh, S.K. (2006). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous media by the marine fungus NIOCC # 312: involvement of lignin-degrading enzymes and exopolysaccharides. *Indian Journal of Marine Sciences* **35**(4): 373-379.
- Raj, D. and Antil, R. S. (2011). Evaluation of maturity and stability parameters of composts prepared from agro-industrial wastes. *Bioresource Technology* **102**(3): 2868-2873.
- Ramachandran, S.; Fontanille, P.; Pandey, A. and Larroche, C. (2008). Permeabilization and inhibition of the germination of spores of *Aspergillus niger* for gluconic acid production from glucose. *Bioresource Technology* **99**(11): 4559-4565.
- Ravelet, C.; Krivobok, S.; Sage, L. and Steiman, R. (2000). Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere* **40**(5): 557-563.

- Read, N. D. and Kalkman, E. R. (2003). Does endocytosis occur in fungal hyphae? *Fungal Genetics and Biology* **39**: 199-203.
- Richnow, H. H.; Seifert, R.; Kästner, M.; Mahro, B.; Horsfield, B.; Tiedgen, U.; Böhm, S. and Michaelis, W. (1995). Rapid screening of PAH-residues in bioremediated soils. *Chemosphere* **31**(8): 3991-3999.
- Rieble, S., Joshi, D. K. and Gold, M. H. (1994). Purification and characterization of a 1,2,4-trihydroxybenzene 1,2-dioxygenase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology* **176**(16): 4838-4844.
- Ritz, K. and Young, I. M. (2004). Interactions between soil structure and fungi. *Mycologist* **18**: 52-59.
- Rodriguez, A.; Perestelo, F.; Carnicero, A.; Regalado, V.; Perez, R.; De la Fuente, G. and Falcon, M. A. (1996). Degradation of natural lignins and lignocellulosic substrates by soil-inhabiting fungi imperfecti. *FEMS Microbiology Ecology* **21**: 213-219.
- Rodriguez, J.; Ferraz, A.; Nogueira, R. P.; Ferrer, I.; Esposito, E. and Durán, N. (1997). Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **62**(2-3): 233-242.
- Romero, M.; Hammer, E.; Hanschke, R.; Arambarri, A. and Schauer, F. (2005). Biotransformation of biphenyl by the filamentous fungus *Talaromyces helicus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **21**(2): 101-106.
- Romero, M. C.; Reinoso, E. H.; Urrutia, M. I. s. and Moreno Kiernan, A. (2006). Biosorption of heavy metals by *Talaromyces helicus*: a trained fungus for copper and biphenyl detoxification. *Electronic Journal of Biotechnology* **9**(3): 221-226.
- Romero, M. C.; Urrutia, M. I.; Reinoso, H. E. and Kiernan, M. M. (2010). Benzo[a]pyrene degradation by soil filamentous fungi. *Journal of Yeast and Fungal Research* **1**(2): 25-29.
- Ron, E. Z. and Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* **13**: 249-252.
- Roncero, C. and Duran, A. (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *Journal of Bacteriology* **163**: 1180-1185.
- Rosenberg, E. and Ron, E. Z. (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**, 154-162.
- Sabaté, J.; Viñas, M. and Solanas, A. M. (2004). Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* **54**(1): 19-25.
- Sack, U. and Günther, T. (1993). Metabolism of PAH by fungi and correlation with extracellular enzymatic activities. *Journal of Basic Microbiology* **33**(4): 269-277.

- Saito, K.; Kuga-Uetake, Y. and Saito, M. (2004). Acidic vesicles in living hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *Plant and Soil* **261**: 231-237.
- Sakuradani, E.; Ando, A.; Ogawa, J. and Shimizu, S. (2009). Improved production of various polyunsaturated fatty acids through filamentous fungus *Mortierella alpina* breeding. *Applied Microbiology and Biotechnology* **84**(1): 1-10.
- Salvo, V. S.; Gallizia, I.; Moreno, M. and Fabiano, M. (2005). Fungal communities in PAH-impacted sediments of Genoa-Voltri Harbour (NW Mediterranean, Italy). *Marine Pollution Bulletin* **50**(5): 553-559.
- Samanta, S. K.; Singh, O. V. and Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology* **20**(6): 243-248.
- Saponaro, S.; Bonomo, L.; Petruzzelli, G.; Romele, L. and Barbafieri, M. (2002). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) slurry phase bioremediation of a Manufacturing Gas Plant (MGP) site aged soil. *Water, Air, & Soil Pollution* **135**(1): 219-236.
- Saraswathy, A. and Hallberg, R. (2002). Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site. *FEMS Microbiology Letters* **210**(2): 227-232.
- Sayara, T.; Borràs, E.; Caminal, G.; Sarrà, M. and Sánchez, A. (2011). Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting: Influence of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation* **65**(6): 859-865.
- Schamfuß, S.; Neu, T. R.; van der Meer, J. R.; Tecon, R.; Harms, H. and Wick, L. Y. (2013). Impact of mycelia on the accessibility of fluorene to PAH-degrading bacteria. *Environmental Science & Technology* **47**: 6908-6915.
- Schauer, F. and Borriss, R. (2004). Biocatalysis and biotransformation. In: Tkacz, J. S. and Lange, L. (eds.). *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture and medicine*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, United States of America: 237-306.
- Schroll, R.; Becher, H. H.; Dörfler, U.; Gayler, S.; Grundmann, S.; Hartmann, H. P. and Ruoss, J. (2006). Quantifying the effect of soil moisture on the aerobic microbial mineralization of selected pesticides in different soils. *Environmental science & technology* **40**(10): 3305-3312.
- Semple, K. T.; Doick, K. J.; Burauel, P.; Craven, A.; Harms, H. and Jones, K. C. (2004). Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental Science and Technology* **38**, 228-231.
- Semple, K. T.; Doick, K. J.; Wick, L. Y. and Harms, H. (2007). Microbial interactions with organic contaminants in soil: Definitions, processes and measurement. *Environmental Pollution* **150**: 166-176.

- Shahsavari, E.; Adetutu, E. M.; Anderson, P. A. and Ball, A. S. (2013). Necrophytoremediation of phenanthrene and pyrene in contaminated soil. *Journal of Environmental Management* **122**(0): 105-112.
- Sijm, D.; Kraaij, R. and Belfroid, A. (2000). Bioavailability in soil or sediment: exposure of different organisms and approaches to study it. *Environmental Pollution* **108**(1): 113-119.
- Singh, J.; Agrawal, M. and Narayan, D. (1995). Changes in soil characteristics around coal-fired power plants. *Environment International* **21**(1): 93-102.
- Singleton, I. (2001). Fungal remediation of soils contaminated with persistent organic pollutants. In: Gadd, G.M. (eds.). *Fungi in Bioremediation*, Cambridge University Press, New York, United States of America: 79-96.
- Site, A. D. (2001). Factors Affecting Sorption of Organic Compounds in Natural Sorbent/Water Systems and Sorption Coefficients for Selected Pollutants. A Review. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **30**(1): 187-439.
- Slifkin, M. and Cumbie, R. (1988). Congo red as a fluorochrome for the rapid detection of fungi. *Journal of Clinical Microbiology* **26**: 827-830.
- Slizovskiy, I. B. and Kelsey, J. W. (2010). Soil sterilization affects aging-related sequestration and bioavailability of p,p'-DDE and anthracene to earthworms. *Environmental Pollution* **158**(10): 3285-3289.
- Spain, J. C. and Nishino, S. F. (1987). Degradation of 1,4-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* **53**(5): 1010-1019.
- Srinivasan, S.; Vargas, M. M. and Roberson, R. W. (1996). Functional, organizational, and biochemical analysis of actin in hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Mycologia* **88**: 57-70.
- Steliga, T.; Jakubowicz, P. and Kapusta, P. (2012). Changes in toxicity during in situ bioremediation of weathered drill wastes contaminated with petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology* **125**(0): 1-10.
- Stevenson, F. J. (1994). Native fixed ammonium and chemical reactions of organic matter with ammonia and nitrite. In: *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions* (2nd edition), John Wiley & Sons, Inc., New York, United States of America: 96-112.
- Stolk, A. C. and Samson, R. A. (1972). Studies on *Talaromyces* and related genera II. The genus *Talaromyces*. *Studies in Mycology* (Baarn) **2**: 1-67.
- Summersgill, M. (2006). Remediation Technology Costs in the UK & Europe; Drivers and Changes from 2001 to 2005. Publication technique.
- Sun, G.-D.; Xu, Y.; Jin, J.-H.; Zhong, Z.-P.; Liu, Y.; Luo, M. and Liu, Z.-P. (2012). Pilot scale ex-situ bioremediation of heavily PAHs-contaminated soil by indigenous microorganisms

- and bioaugmentation by a PAHs-degrading and bioemulsifier-producing strain. *Journal of Hazardous Materials* **233-234**(0): 72-78.
- Syed, K.; Doddapaneni, H.; Subramanian, V.; Lam, Y. W. and Yadav, J. S. (2010). Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **399**(4): 492-497.
- Szentpály, L. s. v. and Ghosh, R. (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogenicity: Theoretical modelling and experimental facts. In: Párkányi, C. (ed.). *Theoretical and Computational Chemistry* Volume **5**, Elsevier, Oxford, United Kingdom: 447-500.
- Tanaka, A. and Fukui, S. (1989). Metabolism of *n*-alkanes. In: Tanaka, A. and Fukui, S. (eds.). *The yeast* (2nd edition) vol. **3**, Academic Press, New York, United States of America: 261-287.
- Taylor, D. L.; Herriott, I. C.; Stone, K. E.; McFarland, J. W.; Booth, M. G. and Leigh, M. B. (2010). Structure and resilience of fungal communities in Alaskan boreal forest soils. *Canadian Journal of Forest Research* **40**: 1288 – 1301.
- Tekere, M.; Read, J. S. and Mattiasson, B. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in extracellular fluids and static batch cultures of selected sub-tropical white rot fungi. *Journal of Biotechnology* **115**(4): 367-377.
- Teng, Y.; Luo, Y.; Ping, L.; Zou, D.; Li, Z. and Christie, P. (2010). Effects of soil amendment with different carbon sources and other factors on the bioremediation of an aged PAH-contaminated soil. *Biodegradation* **21**(2): 167-178.
- Thion, C.; Cébron, A.; Beguiristain, T. and Leyval, C. (2012). PAH biotransformation and sorption by *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* isolated from a polluted soil in axenic cultures and mixed co-cultures. *International Biodeterioration and Biodegradation* **68**: 28-35.
- Torralba, S. and Heath, I. B. (2002). Analysis of three separate probes suggests the absence of endocytosis in *Neurospora crassa* hyphae. *Fungal Genetics and Biology* **37**(3): 221-232.
- Torralba, S.; Raudaskoski, M.; Pedregosa, A. M. and Laborda, F. (1998). Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **144**: 45-53.
- US EPA (1995 a). Presumptive Remedies for Soils, Sediments, and Sludges at Wood Treater Sites. EPA/540/R-95/128
- US EPA (1995 b). Bioventing Principles and Practice (Manual), Volume II: Bioventing design. EPA/625/XXX/001
- US EPA (2006 a). Engineering Issue: In Situ and Ex Situ Biodegradation Technologies for Remediation of Contaminated Sites. EPA/625/R-06/015.

- US EPA – US Environmental Protection Agency (2006 b). How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites: a guide for corrective action plan reviewers.
- US EPA (2009). Soils Policy: Soil Contamination in Europe. Office of Solid Waste and Emergency Response (OSWER), International Fact Sheets.
- Van Bemmelen, J. M. (1890). Ueber die Bestimmung des Wassers, des Humus, des Schwefels, der in den kolloidalen Silikaten gebundenen Kieselsäure, und des Mangans, im Ackerboden. *Landwirtsch Versuchsstat* **37**: 277.
- Van den Brink, H. M.; van Gorcom, R. F. M.; van den Hondel, C. A. M. J. J. and Punt, P. J. (1998). Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **23**(1): 1-17.
- Van Hamme, J. D. (2004). Bioavailability and biodegradation of organic pollutants - a microbial perspective. In: Singh, A. and Ward, O.P. (eds.). Biodegradation and Bioremediation, *Soil Biology Series*, vol. **2**, Springer, New York, United States of America: 37-56.
- Veignie, E.; Rafin, C.; Woisel, P. and Cazier, F. (2004). Preliminary evidence of the role of hydrogen peroxide in the degradation of benzo[a]pyrene by a non-white rot fungus *Fusarium solani*. *Environmental Pollution* **129**: 1-4.
- Veignie, E.; Rafin, C.; Woisel, P.; Lounès-Hadj Sahraoui, A. and Cazier, F. (2002). Metabolization of the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo(a)pyrene by a non-white rot fungus (*Fusarium solani*) in a batch reactor. *Polycyclic Aromatic Compounds* **22**: 87-97.
- Veignie, E.; Vinogradov, E.; Sadovskaya, I.; Coulon, C. and Rafin C. (2012). Preliminary characterizations of a carbohydrate from the concentrated culture filtrate from *Fusarium solani* and its role in benzo[a]pyrene solubilization. *Advances in Microbiology* **2**: 375-381.
- Verdin, A.; Lounès-Hadj Sahraoui, A. and Durand, R. (2004). Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *International Biodeterioration Biodegradation* **53**(2): 65-70.
- Verdin, A.; Lounès-Hadj Sahraoui, A.; Newsam, R.; Robinson, G. and Durand, R. (2005 a). Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environmental Pollution* **133**: 283-291.
- Verdin, A.; Lounès-Hadj Sahraoui, A.; Robinson, G. and Durand, R. (2005 b). Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo[a]pyrene, on the intracellular protein composition of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. *International Biodeterioration Biodegradation* **55**(3): 171-174.

- Vergara-Fernández, A.; Van Haaren, B. and Revah, S. (2006). Phase partition of gaseous hexane and surface hydrophobicity of *Fusarium solani* when grown in liquid and solid media with hexanol and hexane. *Biotechnology Letters* **28**: 2011-2017.
- Viccini, G.; Mannich, M.; Capalbo, D. M. F.; Valdebenito-Sanhueza, R. and Mitchell, D. A. (2007). Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. *Process Biochemistry* **42**(2): 275-278.
- Vida, T. A. and Emr, S. D. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *The Journal of Cell Biology* **128**: 779-792.
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* **73**(7): 1163–1172.
- Wadman, M. W.; de Vries, R. P.; Kalkhove, S. I. C.; Veldink, G. A. and Vliegthart, J. F. G. (2009). Characterization of oxylipins and dioxygenase genes in the asexual fungus *Aspergillus niger*. *BMC Microbiology* **9**: 1-9.
- Waksman, S. A. (1916). Do fungi live and produce mycelium in the soil? *Science* **44** (1131), 320-322.
- Waksman, S. A. (1927). *Principles of Soil Microbiology*, Williams & Wilkins (eds.), Baltimore, United States of America.
- Walker, T. W. and Thompson, R. (1949). Some observations on the chemical changes effected by the steam sterilization of glasshouse soils. *The Journal of Horticultural Science* **25**: 19.
- Wang, H.; Chen, H.; Hao, G.; Yang, B.; Feng, Y.; Wang, Y.; Feng, L.; Zhao, J.; Song, Y.; Zhang, H.; Chen, Y. Q.; Wang, L. and Chen, W. (2013). Role of the Phenylalanine-Hydroxylating system in aromatic substance degradation and lipid metabolism in the oleaginous fungus *Mortierella alpina*. *Applied and Environmental Microbiology* **79**(10): 3225-3233.
- Warcup, J. H. (1951). The ecology of soil fungi. *Transactions of the British Mycological Society* **34**(3): 376-399.
- Warcup, J. H. (1957). Studies on the occurrence and activity of fungi in a wheat-field soil. *Transactions of the British Mycological Society* **40**(2): 237-259.
- Welte, M. A. (2009). Fat on the move: intracellular motion of lipid droplets. *Biochemical Society Transactions* **37**: 991-996.
- White, R.E. and Coon, M.J. (1980). Oxygen activation by cytochrome P-450. *Annual Review of Biochemistry* **49**: 315-356.
- Wick, A.F.; Haus, N.W.; Sukkariyah, B.F.; Haering, K.C. and Daniels, W.L. (2011). Remediation of PAH-contaminated soils and sediments: A literature review. *CSES Department, Internal Research Document*.

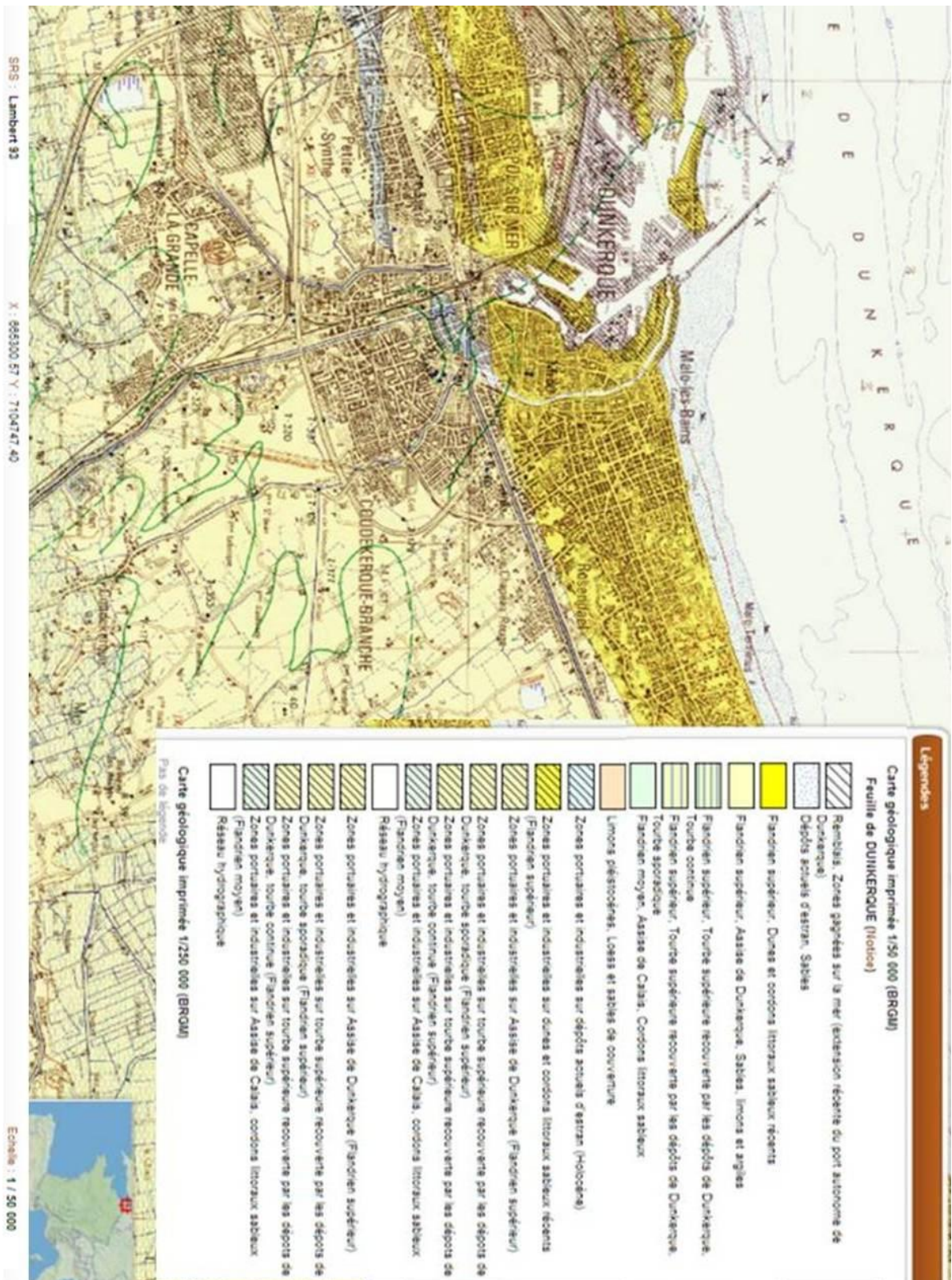
- Wilson, S.C. and Jones, K.C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environmental Pollution* **81**, 229-249.
- Wolf, D. C.; Dao, T. H.; Scott, H. D. and Lavy, T. L. (1989). Influence of Sterilization Methods on Selected Soil Microbiological, Physical, and Chemical Properties. *Journal of Environmental Quality* **18**(1): 39-44.
- Wolfenden, B. S. and Willson, R. L. (1982). Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2[prime or minute]-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **0**(7): 805-812.
- Wu, Y.-R.; He, T.-T.; Lun, J.-S.; Maskaoui, K.; Huang, T.-W. and Hu, Z. (2009). Removal of Benzo[a]pyrene by a fungus *Aspergillus sp.* BAP14. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**: 1395-1401.
- Yamashita, R. A. and May, G. S. (1998). Constitutive activation of endocytosis by mutation of *myoA*, the myosin I gene of *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 14644-14648.
- Zafra, G.; Absalón, Á. E.; Cuevas, M. D. C. and Cortés-Espinosa, D. V. (2014). Isolation and selection of a highly tolerant microbial consortium with potential for PAH biodegradation from heavy crude oil-contaminated soils. *Water, Air, & Soil Pollution* **225**(2): 1-18.
- Zebulun, H.; Isikhuemhen, O. and Inyang, H. (2011). Decontamination of anthracene-polluted soil through white rot fungus-induced biodegradation. *The Environmentalist* **31**(1): 11-19.
- Zhang, X.-X.; Cheng, S.-P.; Zhu, C.-J. and Sun, S.-L. (2006). Microbial PAH-degradation in soil: degradation pathways and contributing factors. *Pedosphere* **16**(5): 555-565.
- Zweytick, D.; Leitner, E.; Kohlwein, S. D.; Yu, C.; Rothblatt, J. and Daum, G. (2000). Contribution of Are1p and Are2p to sterol ester synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **267**: 1075-1082.

Annexes

Sommaire

Sommaire	166
Annexe 1: Fond géologique de la ville de Dunkerque (échelle 1/50 000, Infoterre, BRGM)	167
Annexe 2 : Publication soumise à <i>Environmental Science and Pollution Research</i> (sous presse).....	168
Annexe 3: Curriculum vitae	186

Annexe 1: Fond géologique de la ville de Dunkerque (échelle 1/50 000, Infoterre, BRGM)



Annexe 2 : Publication soumise à *Environmental Science and Pollution Research* (sous presse)

Energy-dependent uptake of benzo[a]pyrene and its cytoskeleton-dependent intracellular transport by the deuteromycete telluric fungus *Fusarium solani*

Antoine Fayeulle^a, Etienne Veignie^a, Christian Slomianny^b, Etienne Dewailly^b, Jean-Charles Munch^c, Catherine Rafin^{a,*}

^a ULCO, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant UCEIV EA 4492, Dunkerque, 59140, France

^b INSERM U 1003, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Université Lille 1, Villeneuve d'Ascq, 59650, France

^c Institute of Soil Ecology, Helmholtz Zentrum München - German Research Center for Environmental Health, Neuherberg, 85764, Germany

* Corresponding author: phone +33 (0)3 28 65 82 78. E-mail: rafin@univ-littoral.fr

ABSTRACT

In screening indigenous soil filamentous fungi for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation, an isolate of the deuteromycete *Fusarium solani* was found that incorporated benzo[a]pyrene (BaP) into fungal hyphae before degradation and mineralization. The mechanisms involved in BaP uptake and intracellular transport remain unresolved. To address this, the incorporation of two PAHs, BaP and phenanthrene (PHE) were studied in this fungus. The fungus incorporated more BaP into cells than PHE, despite the 400-fold higher aqueous solubility of PHE compared with BaP, indicating that PAH incorporation is not based on a simple diffusion mechanism. To identify the mechanism of BaP incorporation and transport, microscopic studies were undertaken with the fluorescence probes Congo Red, BODIPY[®] 493/503 and FM[®] 4-64, targeting different cell compartments, respectively fungal cell walls, lipids and endocytosis. The metabolic inhibitor sodium azide at 100 mM totally blocked BaP incorporation into fungal cells indicating an energy-requirement for PAH uptake into the mycelium. Cytochalasins also inhibited BaP uptake by the fungus and probably its intracellular transport into fungal hyphae. The perfect co-localization of BaP and BODIPY reveals that lipid bodies constitute the intracellular storage sites of BaP in *F. solani*. Our results demonstrate an energy-dependent uptake of BaP and its cytoskeleton-dependent intracellular transport by *F. solani*.

Keywords: Active transport, Benzo[a]pyrene, Confocal microscopy, Endocytosis, *Fusarium solani*

1. Introduction

In a search for indigenous soil filamentous fungi with the potential to degrade high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), our laboratory has isolated a collection of telluric fungi from PAH-contaminated soil (Rafin et al. 2000, 2013; Potin et al. 2004a, 2004b). We focused our attention on a Deuteromycete fungus *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (1881) [teleomorph: *Haematonectria haematococca* (Berk. and Broome) Samuels and Rossman, Ascomycota, Hypocreales, Nectriaceae] which was able to metabolize and mineralize benzo[a]pyrene (BaP) (Rafin et al. 2000, 2006; Veignie et al. 2002). BaP degradation by this isolate led to the formation of distinct metabolites such as 6-hydroxybenzo[a]pyrene sulfate (Veignie et al. 2002) which is known to be produced during intracellular BaP detoxification processes mediated by cytochrome P450 monooxygenase and aryl sulfatases (Rafin et al. 2000, 2006). Moreover, quinones, reported in our previous studies as BaP metabolites, could also be obtained during PAH oxidation by P-450 cytochrome (Cavalieri and Rogan 1985, 1995).

These identified metabolites suggest that PAH degradation by *F. solani* occurs among others intracellularly which requires three successive steps: BaP uptake leading to its incorporation into fungal cells, intracellular transport of BaP to the storage sites and BaP degradation. The mechanisms involved in uptake of hydrophobic organic compounds and their intracellular transport remain unresolved. While numerous works concern the uptake of alkanes by fungi (Cooney et al. 1980; Lindley and Heydeman 1983, 1986a, 1986b) and by yeasts (Käppeli et al. 1984), these mechanisms were rarely considered in relation to PAH uptake by fungi (Wu et al. 2009; Deng et al. 2010). In the present study, we compared the incorporation of two PAHs, respectively BaP as a high molecular weight PAH, and phenanthrene as a low molecular weight PAH, in this fungus as a model organism.

Concerning intracellular transport, recent research has introduced the novel concept of “hyphal pipelines” allowing intracellular fluorene and phenanthrene transport with vesicles in the oomycete *Pythium ultimum* (Schamfuß et al. 2013; Furuno et al. 2012). Cytological observations of similar vesicle-bound PAH were also noticed in our fungus model *F. solani* in previous studies (Rafin et al. 2000). To investigate the mechanisms involved in BaP intracellular transport and storage by this organism, microscopic studies based on wide field epifluorescence and laser scanning confocal microscopy were undertaken by comparing fluorescent cell marking triggered by BaP and fluorescence probes targeting different cell compartments such as Congo Red, BODIPY[®] 493/503 and FM[®] 4-64 (respectively cell walls, lipids and endocytosis). Lastly, we focused our attention on the potential role of the cytoskeleton and energy requirement involved in the vesicles intracellular transport.

2. Materials and methods

2.1. Dyes and other chemicals

The dye Congo Red (disodium 4-amino-3-(4-(4-(1-amino-4-sulfonato-naphthalen-2-yl)diazenylphenyl)phenyl)diazenyl-naphthalene-1-sulfonate) was supplied by Sigma (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). BODIPY (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene BODIPY[®] 493/503) was obtained from Life Technologies SAS (St Aubin, France). FM4-64 (N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide FM[®] 4-64) was supplied by Interchim (Montluçon, France). BaP, PHE and sodium azide (NaN₃) were purchased from Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Cytochalasin B (7(S),20(R)-dihydroxy-16(R)-methyl-10-phenyl-24-oxa[14]cytochalasa-6(12),13(E),21(E)-triene-1,23-dione) was supplied by Santa-Cruz Biotechnology (USA). Hexane (HEX) was supplied by Sigma (St Quentin Fallavier, France), acetone (ACE), acetonitrile and dimethyl sulfoxide (DMSO) by Panreac Química SA (Barcelona, Spain), dichloromethane (DCM), methanol (MeOH) and chloroform (TCM) by Merck (Darmstadt, Germany). Distilled deionized water was used throughout this work.

2.2. Fungal material and inoculum preparation

F. solani, previously isolated from petroleum-contaminated soil, was supplied from our UCEIV mycology collection (Dunkerque, France). This isolate, numbered as isolate 14 ((Rafin et al. 2013), was investigated in previous studies by Rafin et al. (2000, 2006, 2013) and Veignie et al. (2002, 2004, 2012). It was grown on Malt yeast extract agar at 22 °C under a photoperiod of 12 h/12 h. Cultures were grown in Erlenmeyer flasks in 50 mL liquid mineral salts medium (Veignie et al. 2002) with 1 g L⁻¹ yeast extract and 10 g L⁻¹ glucose. After sterilization (121 °C for 20 min), inoculation was performed by adding a spore suspension of *F. solani* (aged 7 days) prepared as described previously (Rafin et al. 2000), so as to obtain a final concentration of ~10⁴ spores mL⁻¹. After inoculation, Erlenmeyer flasks were incubated for 3 days at 22 °C on a reciprocating shaker (Infors, Massy, France) at 90 rpm before filtration. The filtered exponential phase growing mycelium was then used to inoculate cultures for microscopy studies and PAH incorporation experiments.

2.3. PAH incorporation experiments.

2.3.1. Fungal cultures

Inoculation was performed with 150 mg of filtered exponential phase growing mycelium (as described in “Fungal material and inoculum preparation”) introduced in 25 mL MM containing 20 g L⁻¹ glucose. Cultures were grown for 48 h at 22 °C on a reciprocating shaker at 170 rpm. In treatments with PAHs, 250 µg of BaP or PHE initially dissolved in ACE (concentration of PAH stock solution was 0.8 mg mL⁻¹) were deposited into an Erlenmeyer

flask. After total ACE evaporation, 25 mL MM containing 20 g L⁻¹ glucose was added before sterilization and inoculation. Each treatment was prepared in triplicate.

2.3.2. Extraction and HPLC analysis

At the end of the incubation, cultures were filtered onto a Büchner funnel. Mycelia were washed three times in 3 mL of DCM:HEX (1:1) to remove PAHs adsorbed onto hyphae cell walls. Cultures were then lyophilized for 24 h and the dry weight biomass was obtained. The extraction consisted of 5 different steps each conducted in 5 mL of solvent for 4 min at 70 °C under rotation shaking (170 rpm) in the following order: TCM:MeOH (2:1), 2x TCM:MeOH (1:1), ACE:MeOH (1:1) and TCM:MeOH (1:1). Organic fractions were concentrated in 20 mL DCM:MeOH (1:1). PAH concentrations were determined using an HPLC Waters 600 control system fitted with a Waters XTerra®, RP18 column (5 µm) and a Waters 996 Photo Diode Array Detector. Samples were separated using an isocratic solvent (acetonitrile:water, 90:10, v/v) at a solvent flow rate of 1.0 mL min⁻¹ for 10 min. Concentrations were determined by UV absorbance at 254 nm for PHE and 380 nm for BaP. PAH concentration/dried biomass ratio (µg mg⁻¹) was calculated. Results were expressed as mean value ± standard error for three replicates. Statistical analysis was performed by an unpaired Student's t-test (at 99% confidence).

2.4. Microscopy studies

2.4.1. Fungal cultures

Inoculation was performed with 20 mg of filtered exponential phase growing mycelium (as described in “Fungal material and inoculum preparation”) introduced in 5 mL MM with 20 g L⁻¹ glucose. Cultures were grown for 24 h at 22 °C on a reciprocating shaker at 170rpm. In cultures exposed to pollutant, 10 µg BaP initially dissolved in ACE (concentration of PAH stock solution was 0.8 g L⁻¹) was deposited into each Erlenmeyer. After total ACE evaporation, 5 ml MM containing 20 g L⁻¹ glucose was introduced followed by sterilization (121 °C for 20 min) and inoculation.

2.4.2. Treatments for microscopy

5 µL Congo Red stock solution (10 µg mL⁻¹ in H₂O) was directly applied to 10 µL of the fungal culture sample onto a microscope slide prior to the observation. Stock solutions of BODIPY (5 mM in DMSO) and FM4-64 (1.65 mM in water:ethanol, 1:1) were added to the prepared fungal culture 4 h before the observations at final concentrations of 0.1 µM and 7.5 mM respectively. Inhibitors were introduced into Erlenmeyer flasks containing MM without glucose for 4 h in the presence of the filtered exponential phase growing mycelium before introducing BaP for 24 h of incubation. Sodium azide was added directly as powder to

MM at a final concentration of 100 mM before sterilization. Cytochalasin B was added to MM after sterilization at a final concentration of 0.1 g L⁻¹. All combinations with or without BaP or inhibitors were conducted.

2.4.3. Microscopy

Wide field epifluorescence microscopy was performed using an Axiostar plus HB050 microscope (excitation 345 nm, emission 485 nm for BaP, 520 nm for Congo Red). Images were taken with a Canon Power Shot A640 digital camera. Confocal images were obtained using a LSM 780 laser scanning confocal microscope (Zeiss, Le Pecq, France; excitation 405 nm for BaP, 488 nm for BODIPY, 561 nm for FM4-64 and Congo Red) connected to a Zeiss AxioObserver Z1 with a Plan-Apochromat X40/1.3 oil Differential Interference Contrast (DIC) objective. Channels were separately excited and collected in line scan mode. The same instrumental conditions were used throughout the different experiments.

3. Results and discussion

3.1. Ratio of PAH incorporated per mg of biomass versus PAH water solubility

The 48 h incubation of *F. solani* in MM containing PAH and glucose highlighted contrasting patterns between the two PAHs studied. In Fig. 1a, our results clearly indicated that the quantity of BaP incorporated into biomass was 1.2 µg mg⁻¹, 12.0-fold higher than the quantity of PHE incorporated (0.1 µg mg⁻¹). This result was quite surprising considering that the solubility of BaP is 400-fold less than the solubility of PHE, at 0.003 mg L⁻¹ and 1.2 mg L⁻¹, respectively (Fig. 1b). In a general manner, the uptake of low water solubility compounds in eukaryotic cells is far from clear and quite controversial. Three main hypotheses were put forward in the literature concerning hydrocarbons. First, Lindley and Heydeman (1983, 1986) suggested the existence of an active uptake mechanism of dodecane by the filamentous fungus *Cladosporium resinae*. Second, a partitioning phenomenon of PAH between two hydrophobic compartments (namely cell wall lipids and biological membranes) was suggested by Meissel et al. (1973) or between extracellular lipoproteins and the plasma membranes as described by Plant et al. (1985). Lastly, Verdin et al. (2005) proposed a passive diffusion process for BaP incorporation into *F. solani* hyphae. The results obtained in the present study strongly suggested the existence of an active mechanism involved in BaP transport by the *F. solani* cells. Indeed, the higher rate of incorporation of BaP compared with PHE into fungal cells, in spite of the 400-fold higher aqueous solubility of PHE compared with BaP, provides evidence against the principle of a simple diffusion mechanism. Moreover, 82.9% of the initial quantity of BaP was incorporated into the fungal biomass after only 48 h. This result clearly indicated an intracellular accumulation of BaP against the concentration gradient which was not compatible with a

simple diffusion process. To investigate the mechanism of BaP incorporation and transport by *F. solani*, we undertook further microscopic studies using fluorescent probes.

3.2. Localization and identification of BaP storage sites

Microscopic studies were conducted to compare observations of *F. solani* grown in the presence of BaP, used as an autofluorescent probe, by two different microscopic techniques: wide field epifluorescence and laser scanning confocal microscopy. Wide field epifluorescence microscopy clearly allowed the observation of blue-colored fluorescent vesicles associated with hyphae (Fig. 2a) after culturing the fungus for 24 h at 22 °C in contact with BaP. Such vesicles have already been reported to be associated with fungal hyphae. (Rafin et al. 2000; Verdin et al. 2005; Wu et al. 2009; Thion et al. 2012). To confirm the intracellular localization of BaP, we used laser scanning confocal microscopy and Congo Red as a fluorescent marker of fungal cell walls (Roncero and Duran 1985; Slifkin et al. 1988). Under these conditions, the images clearly showed the spatial location of BaP storage sites within the limits of cells (Fig. 2b) especially when those were highlighted by Congo Red (Fig. 2c).

The nature of the cellular compartment involved in BaP storage was investigated through the use of two different fluorescent probes with laser scanning confocal microscopy. As BaP possesses hydrophobic characteristics, it tends to concentrate in nonpolar cell compartments. Thus, we deliberately chose nonpolar fluorescent dyes for identifying BaP storage sites within the fungal hyphae. The water-soluble BODIPY fluorophore was first used offering an unusual combination of nonpolar structures that, upon binding to neutral lipid, emits a fluorescence signal with a narrow wavelength range, making it an ideal tool in multi-labeling experiments. The hydrophobic nature of this dye molecule and its low molecular weight promote a relatively fast diffusion rate through membranes into the nonpolar environment of cells (Johnson et al. 1996; Kamisaka et al. 1999; Saito et al. 2004) Staining with the BODIPY[®] 493/503 has furthermore been described to be more specific for cellular lipid droplets than staining with Nile red (Gocze and Freeman 1994). FM[®] 4-64 has also been used in this study as this fluorescent membrane selective marker was reported to selectively stain yeast and fungi vacuolar membranes allowing the study of endocytosis in eukaryotic cells (Vida and Emr 1995; Fischer-Parton et al. 2000. Read and Kalkman 2003). The comparison of cell labeling triggered by BaP (Fig. 3a) and BODIPY (Fig. 3b) reveals a perfect co-localization of these compounds (Fig. 3d). This enables us to conclude that lipid bodies constitute the intracellular storage sites of BaP in *F. solani*. The BaP concentration in lipid bodies in *F. solani* was first hypothesized by Rafin et al. (2000) and further confirmed by other authors (Wu et al. 2009; Verdin et al. 2005; Thion et al. 2012). To the contrary, the blue fluorescence of BaP never localized with the red fluorescence of FM4-64 (Fig. 3c and 3d). This absence of co-localization indicated that a mechanism different from the associated fungal vacuole endocytic pathway used by FM4-64 was involved in BaP

intracellular transport. Nevertheless, the presence of cell labeling by FM4-64 confirmed the existence of endocytosis by *F. solani*, as demonstrated in a large range of fungal species (Vida and Emr 1995, Yamashita and May 1998; Fischer-Parton et al. 2000; Atkinson et al. 2002; Read and Kalkman 2003).

3.3. Mechanisms involved in BaP uptake

To understand the mechanisms involved in BaP uptake by *F. solani* cells, the same fluorescent probes (BODIPY[®] 493/503 and FM[®] 4-64) were used with laser scanning confocal microscopy in the presence or absence of a metabolic inhibitor (NaN₃) utilized at a high concentration (100 mM). Three cases were observed (Fig. 4): (i) The incorporation of the fluorescent marker FM4-64 was totally blocked by this inhibitor (Fig. 4b and 4e). (ii) No incorporation of BaP fluorescence into fungal cells was observed in the presence of NaN₃ (Fig. 4d) in comparison with the control (Fig. 4a). (iii) As expected, the inhibitor had no effect on the BODIPY cell distribution confirming the occurrence of a simple diffusion process for this fluorescent probe (Fig. 4c and 4f).

As illustrated in Fig. 5, the comparative kinetics of BaP and FM4-64 uptake was carried out over 24 h and observed with epifluorescence microscopy, allowing a temporal and spatial study of the accumulation of both probes into fungal cells. Using FM4-64, cell labeling appeared quite rapidly in 5 min. For BaP, it was 25 min before the first intracellular staining was observed. The fluorescent signals appeared for both treatments first in hyphae apex and fungal branching areas. These observations reinforced the hypothesis of an active BaP uptake mechanism, as these particular zones (apical and branching segments) are well known to be involved in fungal growth and are among the most metabolically active areas. After 24 h, all the hyphae observed were fluorescently labeled. The two probes localized to separate intracellular storage sites, lipid bodies for BaP and endocytosis vacuoles for FM4-64 (as observed in “localization and identification of BaP storage sites”). Finally, the relatively fast incorporation of BaP into fungal cells (i.e. less than 25 min) might indicate that BaP used a constitutive pathway commonly used for natural hydrophobic molecules such as lipid fungal metabolism (Kamisaka and Noda 2001).

In a last experiment, to further characterize the intracellular mechanism involved in BaP transport to lipid bodies, the fluorescence of BaP and BODIPY[®] 493/503 were followed with laser scanning confocal microscopy in the presence or absence of a cytoskeleton inhibitor, cytochalasin B at a high concentration of 0.1 g L⁻¹. Cytochalasins are known as *in vivo* inhibitors of actin polymerization and can therefore be used to study the functions of the actin cytoskeleton in filamentous fungi (Torralba et al. 1998; Srinivasan et al. 1996). In the present study, the transport and concentration of BODIPY into lipid bodies were not altered by the cytochalasin treatment (Fig. 6g and 6h) in comparison with the control (Fig. 6e and 6f). As expected, the intracellular BODIPY localization was not perturbed by this treatment because of its known diffusion process. Moreover, the cell labeling in this treatment was observed instantaneously. Few lipid bodies were noticed corresponding in all probability to the pre-existent lipid bodies present before cytochalasin treatment. This result suggests that the actin cytoskeleton could be involved in the synthesis and motion of lipid bodies (Welte 2009). On the contrary, BaP incorporation into cells was totally inhibited in the presence of cytochalasin (Fig. 6c and 6d) in comparison with BaP control (Fig. 6a and 6b). This observation underlined the fundamental role of actin in BaP intracellular uptake in *F. solani*

reinforcing the hypothesis of an energy-dependent transport mechanism for uptake and most probably BaP transport into fungal hyphae. A similar energy but not actin cytoskeleton-dependent uptake of other exogenous hydrophobic compounds such as phospholipids and storage into lipid bodies were described in an oleaginous fungus *Mortierella ramanniana* var. *angulispora* (Kamisaka et al 1999; Kamisaka and Noda 2001). Moreover, Lindley and Heydeman (1983) also demonstrated that the transport of hydrophobic *n*-alkanes across the cell membrane was an active uptake mechanism in *Cladosporium resinae*, the well-known jet fuel-degrading fungus. For the first time to our knowledge, the involvement of an energy-dependent endocytosis-like mechanism has been demonstrated for the uptake of a high molecular weight PAH (BaP) in *F. solani*. However, in the present research, the absence of colocalization of BaP and FM4-64 clearly demonstrated the occurrence of a fungal specific endocytic pathway for this pollutant, different from the classical endocytosis system usually described in yeast and fungal cells with vacuoles as end points of endocytic vesicles. Our results led to a hypothesis, in line with the vesicle flux model described by Zweytick et al. (2000), where BaP transport would occur through vesicle flux to pre-existing lipid particle structures functioning as a storage compartment. Such an intracellular PAH active transport mediated by lipid vesicles inside the hyphae was recently demonstrated in the oomycete *Pythium ultimum* (Schamfuß et al. 2013; Furuno et al. 2012). These studies promote the rule of mycelia network as a grid of “pipelines” allowing hydrophobic contaminant distribution in soil improving thereby pollutant bioavailability. Our present research confirmed the existence of such a “pipeline” network in a different fungal genus. Moreover, we clearly demonstrated, contrary to the current consensus of fungal PAH uptake by diffusion, that *F. solani* cells used an energy-dependent process first for uptake of the pollutant and second for moving it into fungal hyphae.

Finally, one limiting step of PAH incorporation into microorganisms is the pollutant bioaccessibility, especially for low water solubility pollutants. Once transfer across the membrane has occurred (defined as bioavailability), intracellular transport via vesicle flux, storage, transformation, degradation or further release can take place within the organism. In this study, in presence of the metabolic inhibitor NaN_3 , an intense red coloration was observed. It was localized in the fungal cell walls because of the accumulation of water diffusible FM4-64 at the biological membrane limits (Fig. 4e). In comparison, no BaP accumulation at the fungal cell walls was observed in NaN_3 treatment (Fig. 4d). This result indicated that the extracellular release of a pollutant with very low water solubility to a more accessible form and its transport to the fungal cells required energy contrary to FM4-64 which diffused passively. This microscopic observation reinforced the hypothesis that a biosynthesis of extracellular surfactant-like molecules could enhance BaP solubilization and its transfer to fungal cells before pollutant uptake across cellular walls and membrane (Veignie et al. 2012).

4. Conclusion

The use of filamentous fungi in bioremediation may be advantageous in particular in cases for which low substrate bioavailability limits access to competent microorganisms. In this work, we present evidence that an energy-dependent mechanism is involved in BaP, as a model of a high molecular weight PAH, entrance into the fungal hyphae of a Deuteromycete telluric fungus *Fusarium solani*. Further research is necessary to characterize the molecular

mechanisms of this pollutant transmembrane transport and its eventual ubiquity throughout the fungal kingdom. In fungal bioremediation applied to PAH polluted soil, a diffusion process occurring through the cell wall and plasma membrane has been currently proposed as a potential pollutant uptake mechanism. Such a passive process, being proportional only to the water soluble fraction of the compound, limits significantly the pollutant mass transfer into cells to degradation sites. On the contrary, an energy dependent mechanism, as demonstrated in this work, may be a promising avenue for enhancing fungal biodegradation of organic pollutants for the following reasons. It would enhance the pollutant quantity incorporated into cells even for those compounds with low water solubility. Consequently, mycelia could then increase the pollutant intracellular transport through dense hyphal networks either to their own intracellular degradation sites if the species considered are themselves good pollutant-degrading ones, or to other indigenous competent isolates (bacteria or fungi) living in the vicinity (Schamfuß et al. 2013; Furuno et al. 2012). This energetic entrance process could permit a faster PAH incorporation into fungal cells (i.e. 82.9% of the initial quantity of BaP was incorporated into the fungal biomass after only 48 h). In fact, one of the major pitfalls of bioremediation techniques was due to the difficulty of preserving active fungal PAH degraders for enough time (several months) to allow for pollutant biodegradation. This last point must be taken under consideration for developing promising monitored fungal-based technologies as less energy would be required and remediation may be less time consuming.

Acknowledgments

Financial support for this research was provided by Agency for the Environment and Energy Management (ADEME) and the Région Nord-Pas de Calais.

References

- Atkinson HA, Daniels A, Read ND (2002) Live-cell imaging of endocytosis during conidial germination in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genet Biol* 37:233-244
- Cavaliere EL, Rogan EG (1985) Role of radical cations in aromatic hydrocarbon carcinogenesis *Environ Health Persp* 64:69-84
- Cavaliere EL, Rogan EG (1995) Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica* 25:677-688
- Cooney JJ, Siporin C, Smucker RA (1980) Physiological and cytological responses to hydrocarbons by the hydrocarbon-using fungus *Cladosporium resinae*. *Bot Mar* 23:227-232
- Deng Y, Zhang Y, El-Latif Hesham A, Liu R, Yang M (2010) Cell surface properties of five polycyclic aromatic compound-degrading yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1933-1939

- Fischer-Parton S, Parton RM, Hickey PC, Dijksterhuis J, Atkinson HA, Read ND (2000) Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J Microsc* 198:246-259
- Furuno S, Foss S, Wild E, Jones KC, Semple KT, Harms H, Wick LY (2012) Mycelia Promote Active Transport and Spatial Dispersion of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ Sci Technol* 46:5463-5470
- Gocze PM, Freeman DA (1994) Factors underlying the variability of lipid droplet fluorescence in MA-10 leydig tumor cells. *Cytometry* 17:151-158.
- Johnson ME, Berk DA, Blankschtein D, Golan DE, Jain RK, Langer RS (1996) Lateral diffusion of small compounds in human stratum corneum and model lipid bilayer systems. *Biophys J* 71:2656-2668.
- Kamisaka Y, Noda N, Sakai T, Kawasaki K (1999) Lipid bodies and lipid body formation in an oleaginous fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispora*. (BBA) – Mol. Cell Biol. L. 1438:185-198
- Kamisaka Y, Noda N (2001) Intracellular Transport of Phosphatidic Acid and Phosphatidylcholine into Lipid Bodies in an Oleaginous Fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispora*. *J Biochem* 129:19-26
- Käppeli O, Walther P, Mueller M, Fiechter A (1984) Structure of the cell surface of the yeast *Candida tropicalis* and its relation to hydrocarbon transport. *Arch Microbiol* 138:279-282
- Lindley ND, Heydeman MT (1983) Uptake of vapour phase [¹⁴C]Dodecane by whole mycelia of *Cladosporium resinae*. *J Gen Microb* 129:2301-2305
- Lindley ND, Heydeman MT (1986a) The uptake of n-alkanes from alkane mixtures during growth of the hydrocarbon-utilizing fungus *Cladosporium resinae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 23:384-388
- Lindley ND, Heydeman MT (1986b) Mechanism of Dodecane Uptake by Whole Cells of *Cladosporium resinae*. *J Gen Microbiol* 132:751-756
- Meissel MN, Medvedeva GA, Kozlova TM, Pomoshnikova NA, Zaikina AI, Fedoseeva GE (1973) Regularities of penetration into yeast cells of higher fatty acids and hydrocarbons, their intracellular migration and concentration. Proc of the third International Specialized Symposium on Yeasts II:149-168
- Plant AL, Benson DM, Smith LC (1985) Cellular uptake and intracellular localization of benzo(a)pyrene by digital fluorescence imaging microscopy. *J Cell Biol* 100:1295-1308

- Potin O, Rafin C, Veignie E (2004a) Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *Int Biodeterior Biodegrad* 54:45-52
- Potin O, Veignie E, Rafin C (2004b) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiol* 51:71-78
- Rafin C, Potin O, Veignie E, Lounes-Hadj Sahraoui A, Sancholle M (2000) Degradation of benzo[a]pyrene as sole carbon source by a non white rot fungus, *Fusarium solani*. *Polycycl Aromat Comp* 21:311–329
- Rafin C, Veignie E, Woisel P, Cazier F, Surpateanu G (2006) New potential of a deuteromycete fungus *Fusarium solani* in benzo[a] pyrene degradation: an eco-physiological hypothesis? In: Glazer MP (ed) *New frontiers in environmental research*. Nova Science, New York, pp 165–179
- Rafin C, De Foucault B, Veignie E (2013) Exploring micromycetes biodiversity for screening benzo[a]pyrene degrading potential. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20: 3280-3289
- Read ND, Kalkman ER (2003) Does endocytosis occur in fungal hyphae? *Fungal Genet Biol* 39:199-203
- Roncero C, Duran A (1985) Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J Bacteriol* 163:1180-1185
- Saito K, Kuga-Uetake Y, Saito M (2004) Acidic vesicles in living hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *Plant Soil* 261:231-237
- Schamfuß S, Neu TR, van der Meer JR, Tecon, R, Harms H, Wick LY (2013) Impact of Mycelia on the Accessibility of Fluorene to PAH-Degrading Bacteria. *Environ Sci Technol* DOI 10.1021/es304378d
- Slifkin M, Cumbie R (1988) Congo red as a fluorochrome for the rapid detection of fungi. *J Clin Microbiol* 26:827-830
- Srinivasan S, Vargas MM, Roberson RW (1996) Functional, Organizational, and Biochemical Analysis of Actin in Hyphal Tip Cells of *Allomyces macrogynus*. *Mycologia* 88:57-70
- Thion C, Cébron A, Beguiristain T, Leyval C (2012) PAH biotransformation and sorption by *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* isolated from a polluted soil in axenic cultures and mixed co-cultures. *Int Biodeterior Biodegrad* 68:28-35
- Torralba S, Raudaskoski M, Pedregosa AM, Laborda F (1998) Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 144:45-53

- Veignie E, Rafin C, Woisel P, Lounes-Hadj Sahraoui A, Cazier F (2002) Metabolization of the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo(a)pyrene by a non-white rot fungus (*Fusarium solani*) in a batch reactor. *Polycycl Aromat Comp* 22:87-97
- Veignie E, Rafin C, Woisel P, Cazier F (2004) Preliminary evidence of the role of hydrogen peroxide in the degradation of benzo[a]pyrene by a non-white rot fungus *Fusarium solani*. *Environ Pollut* 129:1-4
- Veignie E, Vinogradov E, Sadovskaya I, Coulon C, Rafin C (2012) Preliminary characterizations of a carbohydrate from the concentrated culture filtrate from *Fusarium solani* and its role in benzo[a]pyrene solubilization. *Adv Microbiol* 2:375-381
- Verdin A, Lounès-Hadj Sahraoui A, Newsam R, Robinson G, Durand R (2005) Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environ Pollut* 133:283-291
- Vida TA, Emr SD (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* 128 (5):779-792
- Welte MA (2009) Fat on the move : intracellular motion of lipid droplets *Biochem Soc Trans* 37:991-996
- Wu YR, He TT, Lun JS, Maskaoui K, Huang TW, Hu Z (2009) Removal of benzo[a]pyrene by a fungus *Aspergillus* sp. BAP14. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1395-1401
- Yamashita RA, May GS (1998) Constitutive Activation of Endocytosis by Mutation of myoA, the Myosin I Gene of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* 273:14644-14648
- Zweytick D, Leitner E, Kohlwein SD, Yu C, Rothblatt J, Daum G (2000) Contribution of Are1p and Are2p to steryl ester synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 267:1075-82

Fig. 1: Ratio of PAH incorporated per mg of dried biomass compared with PAH water solubility

a. Aqueous solubility (mg L^{-1}) of benzo[a]pyrene (BaP) and phenanthrene (PHE)

b. Uptake of each PAH by exponentially growing *F. solani* cells after 48 h of incubation at 22 °C in PAH-containing liquid MM with glucose (mean value \pm standard error for triplicates).

Statistical analysis performed by an unpaired Student's t-test (at 99 % confidence)

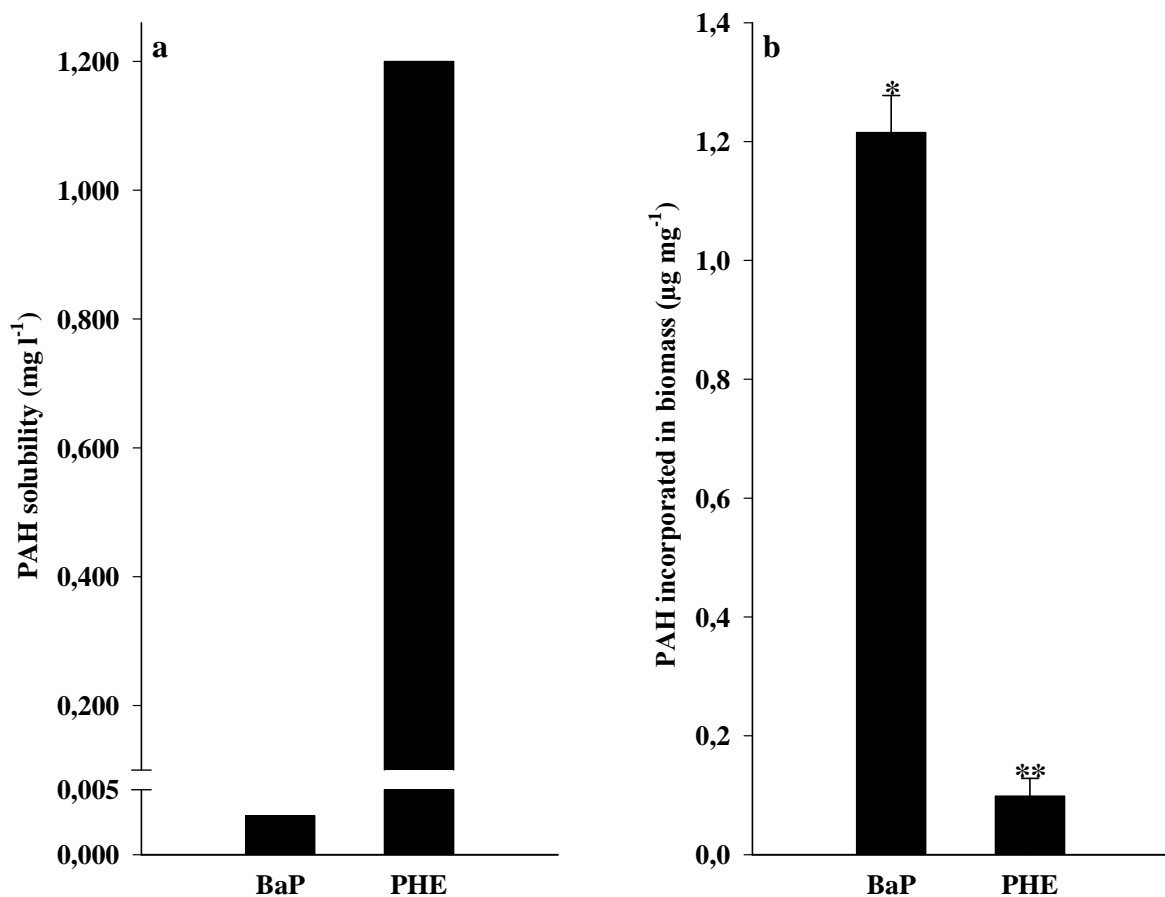


Fig. 2: Vesicles labeled by the blue fluorescence of BaP in *F. solani* viewed using three different microscopic techniques:

- a. Wide field epifluorescence microscopy
- b. Confocal microscopy with DIC mode and 405 nm excitation
- c. Dual labeling of hyphae with Congo Red and BaP, observed with laser scanning confocal microscope. BaP and Congo Red stained fungal vesicles in blue and fungal cell wall in red respectively.

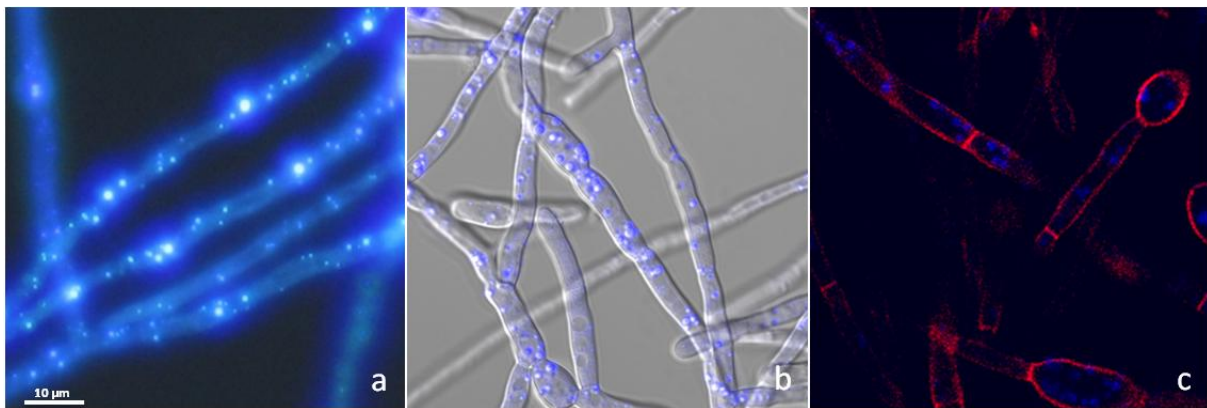


Fig. 3: Confocal microscope images of the intracellular location of three fluorescent molecules in one *F. solani* hyphae optical section:

- a. Benzo[a]pyrene (405 nm filter)
- b. BODIPY (488 nm filter)
- c. FM4-64 (561 nm filter)
- d. Benzo[a]pyrene, BODIPY and FM4-64 merged images

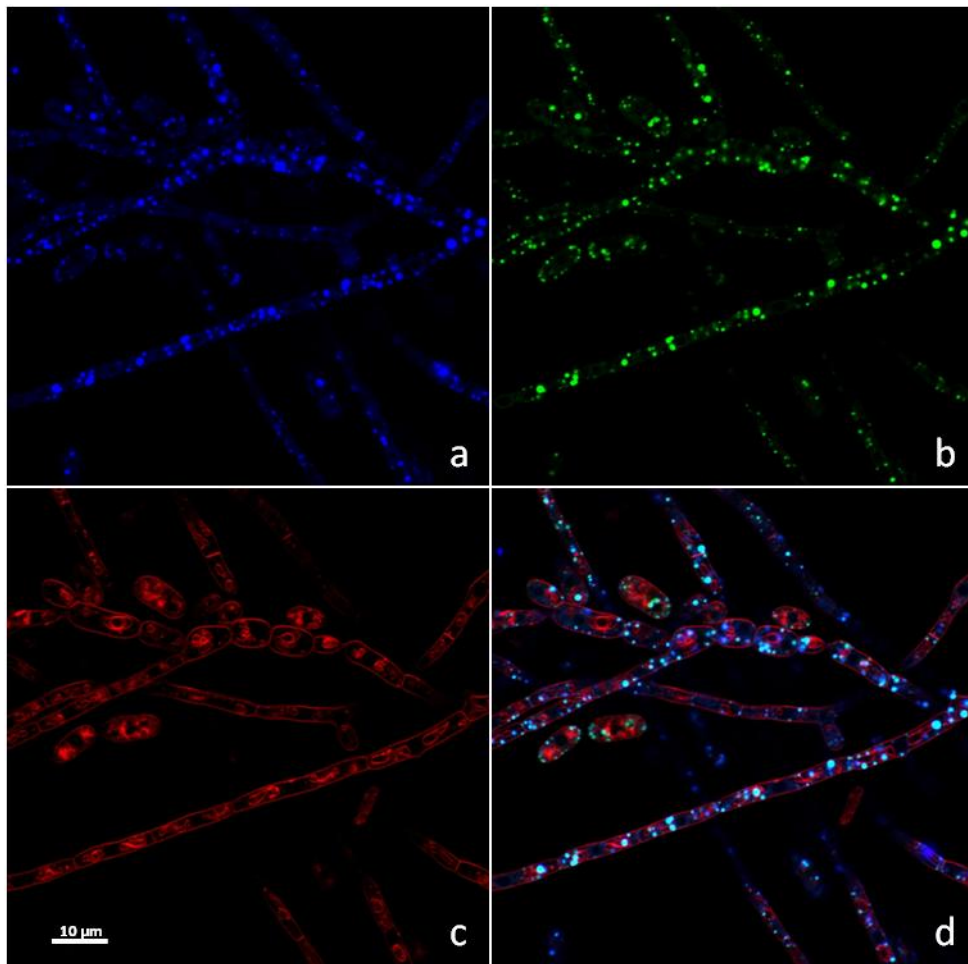


Fig. 4: Effect of 100 mM NaN₃ on the incorporation of BaP (405 nm filter), FM4-64 (561 nm filter) and BODIPY (488 nm filter) in *Fusarium solani* hyphae (laser scanning confocal microscopy):

a. b. c. Control

d. e. f. NaN₃ treatment

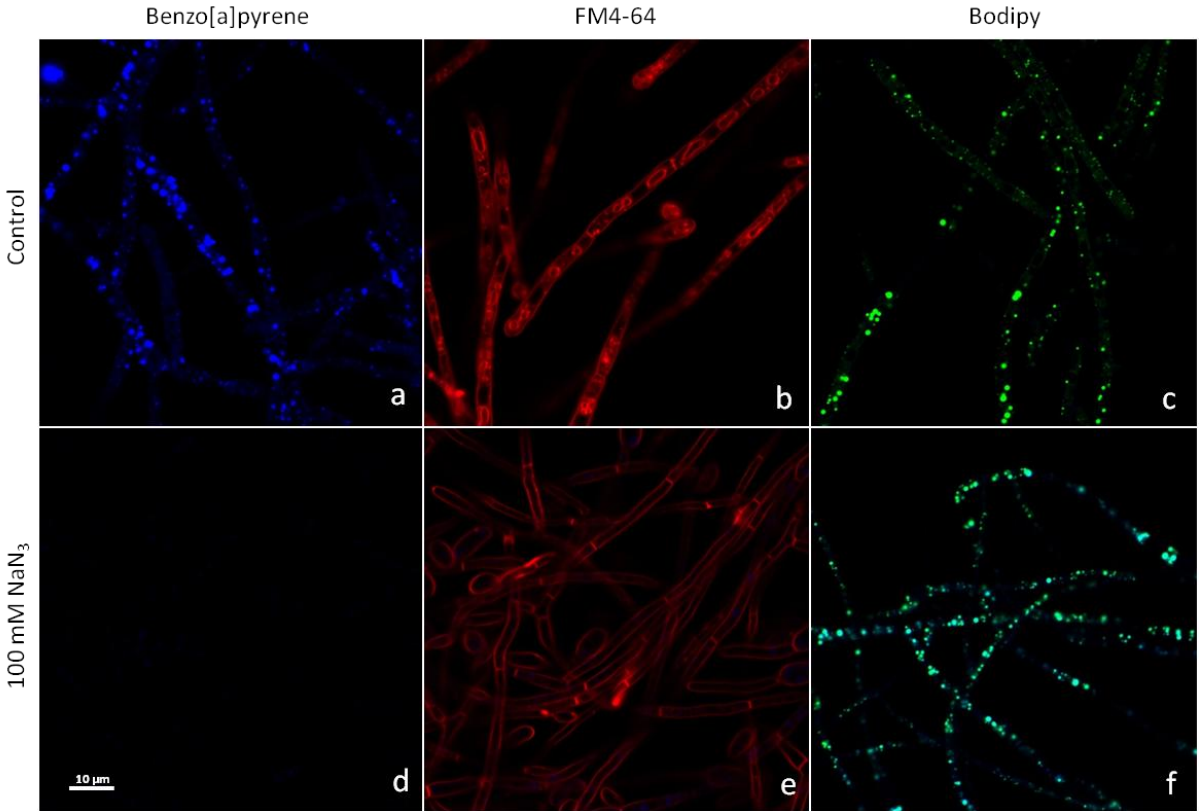


Fig. 5: Comparative time course of BaP (405 nm filter) and FM4-64 (561 nm filter) incorporation in *Fusarium solani* hyphae (wide field epifluorescence microscopy)

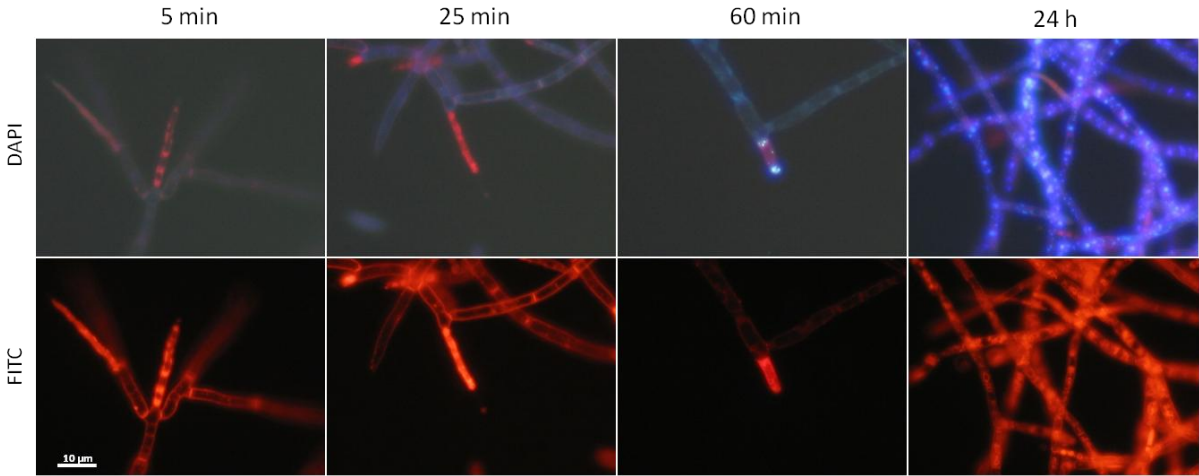


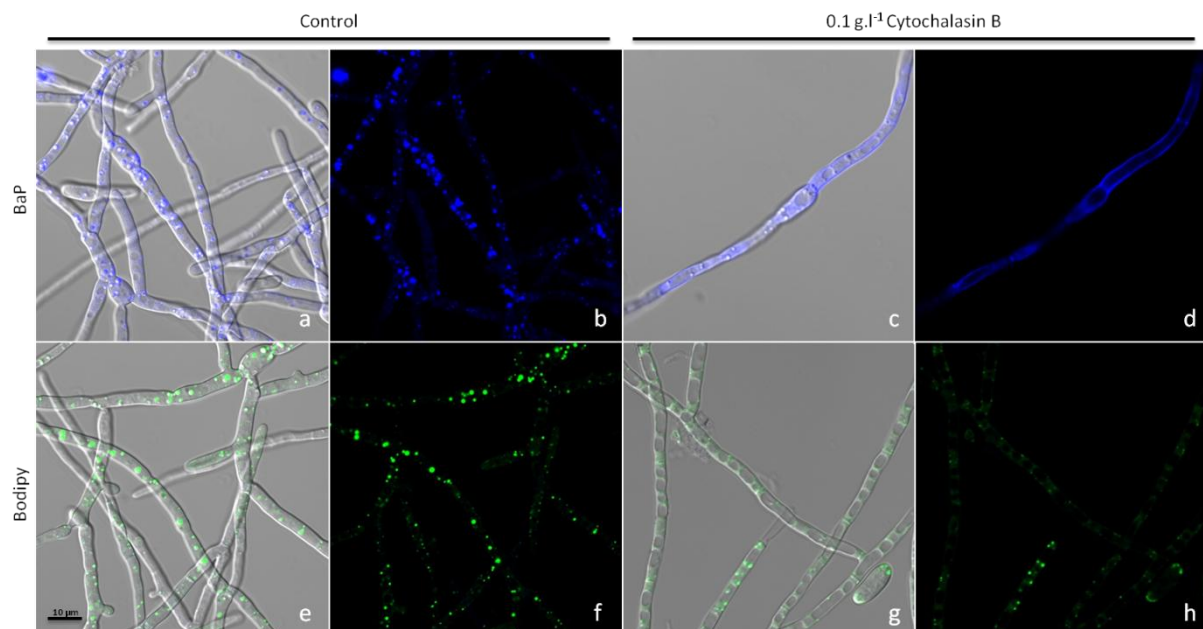
Fig. 6: Effect of the cytoskeleton inhibitor, cytochalasin B (0.1 g L^{-1}) on transport of BaP and BODIPY into *F. solani* lipid bodies.

BaP control: DIC (a) and 405 nm laser line (b)

BODIPY control: DIC (e) 488 nm laser line (f)

BaP with cytochalasin B treatment under DIC (c) and with laser scanning confocal microscope (d)

BODIPY with cytochalasin B treatment under confocal DIC (g) and with laser scanning confocal microscope (h)



Annexe 3: Curriculum vitae

Antoine FAYEULLE

27 years old (28th July 1986), single, childless

Driving licence type B

15 rue Richelieu

F-62100 CALAIS

Tel. (0033)3.21.34.18.39 / Mobile (0033)6.86.64.89.76



Object: **PhD thesis**

Education and training

- 2010-2013 PhD about fungal bioremediation of PAH contaminated soils (funding: ADEME/Nord-Pas-de-Calais region)
Joint Supervision: ULCO, Dunkerque/TUM (Technische Universität München), Munich
- 2010 Diploma of Biotechnology Engineering and Master ISIE (Engineering & Science for the Environment)
ESBS (Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg), UDS (Université de Strasbourg)
- 2007 Bachelor in Biology with honors (Mention Très Bien)
ULCO (Université du Littoral Côte d'Opale), Calais
- 2004 Science-based baccalauréat, Physics option (Mention Bien)
Lycée Pierre de Coubertin, Calais

Professional experience

- 2013-2014 **Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (10 months)**
ULCO (Université du Littoral Côte d'Opale) - CGU CALAIS / 50 rue F. Buisson BP 699 / F-62228 CALAIS
- 2010 **Internship (6 ½ months)**
Role of the different physiological microbial communities in the natural attenuation of BTEX contaminated aquifers
Dr. Wilfried F.M. Röling / Molecular Cell Physiology, FALW, VU University Amsterdam
De Boelelaan 1085 / NL-1081 HV Amsterdam (The Netherlands)
- 2009 **Internship (6 weeks)**
Assessment of the genotoxic effect of heavy metals on *Trifolium repens* through comet assay
Dr. Bertrand POURRUT, PhD / Assistant professor in Ecotoxicology
Laboratoire Sols et Environnement / Institut Supérieur d'Agriculture
48 boulevard Vauban / F-59046 Lille cedex - FRANCE
- 2008 **Internship (6 weeks)**
Research of an optimization method of the Benzo[a]pyrene degradation by *Fusarium solani* with the object of the development of bioremediation processes
Dr. C. Rafin and Dr. E. Veignie
Laboratoire de Synthèse Organique et Environnement / Maison de la Recherche en Environnement Industriel (MREI 1)
145 avenue Maurice Schumann / F-59140 DUNKERQUE
- 2006 **Internship (2 weeks)**
Pedagogy of environment, presentation of the permanent exposition in the nature house, guided tour on the fauna and flora themes within the Baden-Württemberg wildlife
Naturschutzzentrum Südschwarzwald
Dr. Pilet Spur 4 / D-79868 FELDBERG
- 2006 **Internship (2 weeks)** (Rafin, C., *et al.* 2009. Benzo[a]pyrene degradation using simultaneously combined chemical oxidation, biotreatment with *Fusarium solani* and cyclodextrins. *Bioresour. Technol.* 100, 3157-3160)
Acquisition of the techniques of culture, purification of biomolecules and characterisation
Dr. C. Rafin and Dr. E. Veignie
Laboratoire de Synthèse Organique et Environnement / Maison de la Recherche en Environnement Industriel (MREI 1)
145 avenue Maurice Schumann / F-59140 DUNKERQUE

Competences

- Biology:**
- Cell's ultra-structure study via electronic and fluorescence microscopy
 - Experiments in a sterile environment, techniques of culturing, isolating and counting of bacterial and fungal colonies, mycology and metabolism study with diverse media
 - Use of the different chromatographies, electrophoreses and ELISA methods
 - In vitro vegetative reproduction through the use of phytohormons and transformation techniques
 - Cloning, recombinant vector production and expression of the protein of interest; PCR, RT-PCR, DGGE
- Informatics:**
- Linux, Macintosh, Windows
 - Microsoft Office™-Programm (Word™, Excel™ and PowerPoint™), XLSTAT, R
 - Winbio, BSL Pro 7.0, Image J, SoftMax® Pro, LSM Image Browser
- Languages:** French (mother tongue), German and English (usual and professional use)

Interests

Sport: Tennis, Table tennis, Swimming / **Hobbies:** Photography, Hiking, Plant identification, Entomology

Détails du projet de thèse doctorale (2010-2013)

Thèse réalisée en cotutelle: entre la Technische Universität München (TUM), Allemagne et l'Université du littoral Côte d'Opale (ULCO), France

Co-directeurs de la thèse: Pr. Dr. Jean-Charles MUNCH (TUM), Dr. Catherine RAFIN (ULCO)

L'inscription en cotutelle a été effectuée au Centre des Sciences Weihenstephan pour l'alimentaire, l'utilisation des terres et l'environnement (Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, WZW) de l'Université Technique de Munich sous la codirection du Pr. Munch.

L'inscription en France a été réalisée au niveau de l'ULCO à l'Ecole Doctorale Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement (SMRE) n°104 du Pôle de Recherche et Enseignement Supérieur (PRES) Université de Lille Nord de France (ULNF) en filière Ingénierie des Fonctions Biologiques (IFB)

Travaux de recherche réalisés entre les équipes partenaires de la cotutelle de thèse

Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV) EA 449, Dunkerque, France

Encadrants scientifiques: Dr. C. Rafin et Dr. E. Veignie

Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV) EA 449, Equipe "Interactions Plantes-Champignons et Remédiation", 145 Avenue Maurice Schumann, 59140 Dunkerque, France. Directeur: Pr. P. Shirali puis D. Courcot administrateur provisoire

Institut d'Ecologie des Sols (IBÖ) du Helmholtz Zentrum de Munich, Allemagne

Encadrants scientifiques: Pr. Dr. J. C. Munch (directeur de l'Institut d'Ecologie des Sols), Dr. K. Pritsch (chef du groupe de recherche "Ecologie du système Plante Sol") et Dr. R. Schroll (chef du groupe de recherche "Interactions entre xénobiotiques organiques et systèmes Sol-Plantes")

Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health (GmbH), Institute of Soil Ecology, Ingolstädter Landstraße 1, D - 85764 Neuherberg, Allemagne.

Séjours de recherche en Allemagne: du 04/11/2012 au 21/12/2012 et du 07/01/2013 au 01/06/2013

Financement: ADEME (50%) et la région Nord-Pas de Calais (50%).

Obtention de financement d'aides à la mobilité internationale: Partenariat Hubert Curien PHC PROCOPE (2012-2013). Porteur de projet France: C. Rafin, Porteur de projet Allemagne: Pr. Dr.Munch

Valorisations

Publications avec comité de lecture

1. RAFIN C., VEIGNIE E., FAYEULLE A., SURPATEANU G.: Benzo[a]pyrene degradation using simultaneously combined chemical oxidation, biotreatment with *Fusarium solani* and cyclodextrins. *Bioresource Technology* **100**(12), 3157–3160, 2009. (IF 4.750)
2. FAYEULLE A., VEIGNIE E., SLOMMIANY C., DEWAILLY E., MUNCH J. C., RAFIN C.: Energy-dependent uptake of benzo[a]pyrene and its cytoskeleton-dependent intracellular transport by the deuteromycete telluric fungus *Fusarium solani*. *Environmental Science and Pollution Research*. Minor Revision. (IF 2.618)

Communications orales nationales

1. RAFIN C., ROSU A.M., FAYEULLE A., FOURMENTIN S., LANDY D., VEIGNIE E.: Utilisation des polysaccharides naturels ou modifiés pour la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques par les champignons telluriques saprotrophes, "3èmes Journées du Club Français des Cyclodextrines" Dunkerque, 9-10 décembre 2010.
2. FAYEULLE A., VEIGNIE E., SLOMIANNY C., DEWAILLY E., MUNCH J.C., RAFIN C. Transport actif et stockage intracellulaire du benzo[a]pyrène chez *Fusarium solani*. 9e Congrès National de la Société Française de Microbiologie, Lille, France, Février 2013.

Communications orales nationales par affiche

1. FAYEULLE A., VEIGNIE E., MUNCH J.C., RAFIN C.: Diversité et fonctionnalité des champignons saprotrophes telluriques et leur utilisation pour la bioremédiation des sols contaminés par des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques. Premières Journées Techniques du réseau SAFIR. "Les sites ateliers: nouveaux outils pour la recherche et le développement sur les sites pollués", Mai 2012, Roubaix

Séminaires ADEME

- A. Fayeulle. 2011. Séminaire interne de l'ADEME recherche "Sites et sols pollués" des 13 et 14 Janvier 2011 à Angers. Présentation orale du plan de thèse.
- A. Fayeulle. 2011. Journées d'accueil des doctorants ADEME les 10 & 11 Février 2011 à Paris. Poster présentant le sujet de thèse, le doctorant et les raisons du financement ADEME. A. Fayeulle, E. Veignie, J.C. Munch and C. Rafin. Diversité et fonctionnalité des champignons saprotrophes telluriques et leur utilisation pour la bioremédiation des sols contaminés par des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.
- A. Fayeulle. 2012. Participation aux Rencontre Doctorants ADEME (Angers, 31 janvier & 1er février 2012): les Doctorants de deuxième année ont participé à une table ronde, présentation de leur sujet de thèse en 5 minutes.

Séminaire UCEIV ULCO

A. Fayeulle, E. Veignie, J.C. Munch and C. Rafin. 2012. Diversité et fonctionnalité des champignons saprotrophes telluriques et leur utilisation pour la bioremédiation des sols pollués par des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques: résultats préliminaires. 4 Octobre 2012. Présentation orale lors du séminaire des Doctorants. UCEIV, ULCO.

Formations

Participation à une Summer school: Functions of microbial communities in soils: sustainable use of biotic resources. Munich, Allemagne, 4-14 Octobre 2011.

ED SMRE, filière IFB, PRES ULNF: Formations "Mener sa thèse en mode projet" (10 crédits) et "Financement de la recherche sur projet" (10 crédits), Summer School (20 crédits), Séjour en laboratoire étranger (20 crédits)

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ULCO)

Sur l'année universitaire 2013/2014, ATER à l'Université du Littoral Côte d'Opale ULCO (Centre de Gestion Universitaire, Calais, France) intervenant en Licence de Biologie (Département de Sciences de la Vie et de la Nature) et en DEUST Technicien en Milieu Littoral (TML):

Biochimie: Travaux Pratiques niveau DEUST 1 (10,67 h équivalent TD) et Licence 2 (13,33 h équivalent TD)

Biologie cellulaire: Travaux Pratiques niveau DEUST 1 (4 h équivalent TD) / Travaux Dirigés et Travaux Pratiques niveau Licence 1 (35 h équivalent TD)

Botanique: Travaux Pratiques niveau DEUST 1 (12 h équivalent TD) et Licence 1 (12 h équivalent TD)

Histologie/Cytologie: Travaux Dirigés et Travaux Pratiques niveau Licence 1 (29,33 h équivalent TD)

Biologie Végétale: Travaux Pratiques niveau Licence 2 (18 h équivalent TD)

Environnement: Travaux Pratiques niveau Licence 2 (6,67 h équivalent TD, excursion sur le terrain)

Travaux Personnels Encadrés: niveau Licence 2 (6 h équivalent TD) et niveau Licence 3 (8,5 h équivalent TD, excursion sur le terrain et réalisation d'un herbier)

Tables

Table des figures

<i>Figure i 1: Distribution des secteurs contribuant à la contamination des sols en Europe avec un focus particulier sur les activités industrielles et commerciales (Panagos et al., 2013).....</i>	<i>3</i>
<i>Figure i 2: Définition des notions de biodisponibilité et de bioaccessibilité (Semple et al., 2007)</i>	<i>5</i>
<i>Figure i 3: Classement 2010 des filières et techniques de traitement des sols pollués par tonnage hors confinement et stockage (ADEME, 2012 ; HS = Hors Site).....</i>	<i>8</i>
<i>Figure i 4: Ultrastructure de la cellule fongique et catégories d'hyphes présentes chez les espèces filamenteuses</i>	<i>11</i>
<i>Figure i 5: Voies métaboliques de biodégradation des HAP (Cerniglia, 1992)</i>	<i>13</i>
<i>Figure i 6: Etapes clés du processus de bioremédiation fongique des HAP en sol sur l'exemple du Benzo[a]pyrène (BaP), un HAP de haute masse molaire.....</i>	<i>14</i>
<i>Figure I 1: Techniques d'isolement employées dans la constitution de la mycothèque</i>	<i>29</i>
<i>Figure I 2: Fond géologique du site atelier de l'Union (Echelle 1/25 000 ; Infoterre, BRGM, 2013).....</i>	<i>32</i>
<i>Figure I 3: Localisation du site de l'Union sur la carte pédologique de la région de Roubaix (échelle 1/50 000 ; extrait de la carte des pédopaysages ; sources : Région Nord-Pas-de-Calais, Ministère de l'Agriculture, DRAF-SRHA-Mission Sol-2000).....</i>	<i>33</i>
<i>Figure I 4: Positionnement géographique des sites d'échantillonnage au niveau du site atelier de l'Union (Echelle 1/10 000, Zoom x 2 ; Source : GIS3SP).....</i>	<i>34</i>
<i>Figure I 5: Historique de l'exploitation du site de l'usine à gaz sur la zone de l'Union.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure I 6: Carte pédologique de la région de Dunkerque (échelle 1/50 000 ; extrait de la carte des pédopaysages ; sources : Région Nord-Pas-de-Calais, Ministère de l'Agriculture, DRAF-SRHA-Mission Sol-2000).....</i>	<i>37</i>
<i>Figure I 7: Carte géologique de la ville de Chambly (échelle 1/25 000 ; Infoterre, BRGM, 2013)</i>	<i>38</i>
<i>Figure I 8: Historique de l'exploitation du site de Moulin Neuf</i>	<i>38</i>
<i>Figure I 9: Contaminations en HAP totaux et proportion des HAP de la liste US EPA répartis par classe</i>	<i>40</i>
<i>Figure I 10: Profils de contamination par les 16 HAP de la liste US EPA dans les échantillons de sol... ..</i>	<i>42</i>
<i>Figure I 11: Texture des échantillons de sol industriel.....</i>	<i>43</i>
<i>Figure I 12: Teneurs hydriques moyennes des échantillons de sols équilibrés à un potentiel hydrique de -150 hPa.....</i>	<i>45</i>
<i>Figure I 13: Teneurs en matières organiques des échantillons de sol et classification selon le référentiel utilisé par Martin et Nolin (1991).....</i>	<i>46</i>
<i>Figure I 14: Teneurs en carbone et azote des échantillons de sol</i>	<i>47</i>

<i>Figure I 15: Ratios C/N des échantillons de sol et les conséquences théoriques sur la décomposition des matières organiques selon le référentiel de Duchaufour (1988, à droite).....</i>	<i>48</i>
<i>Figure I 16: pH des échantillons de sol et classification selon le référentiel pédologique (AFES, 1995)</i>	<i>49</i>
<i>Figure I 17: Capacités d'échange cationique effectives des échantillons de sol et classification utilisée par Martin et Nolin (1991, à droite).....</i>	<i>50</i>
<i>Figure I 18: Nombres de particules de sol présentant des hyphes après 24h et de souches métaboliquement actives isolées via la technique d'inoculation directe (Waksman, 1916) par échantillon de sol.....</i>	<i>52</i>
<i>Figure I 19: Densités de population fongique moyennes des échantillons de sol mesurées par la méthode de suspension/dilution après 6 jours d'incubation (cfu = colony-forming unit).....</i>	<i>53</i>
<i>Figure I 20: Photographie de l'apparence des cultures des 30 isolats après 2 semaines d'incubation sur MEA.....</i>	<i>54</i>
<i>Figure II 1: Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale en fonction des questions scientifiques posées.....</i>	<i>63</i>
<i>Figure II 2: Réaction colorimétrique de mesure des activités de type peroxydase.....</i>	<i>71</i>
<i>Figure II 3: Formule développée de la structure moléculaire de l'Azur B.....</i>	<i>72</i>
<i>Figure II 4: Formule développée de la structure moléculaire de l'ABTS.....</i>	<i>73</i>
<i>Figure II 5: Formule développée de la réaction colorimétrique catalysée par l'activité époxydase du cytochrome P450.....</i>	<i>73</i>
<i>Figure II 6: Réaction d'ouverture de cycle catalysée par les catéchol 1,2- (position ortho) et 2,3-dioxygénases (position méta).....</i>	<i>74</i>
<i>Figure II 7: Schéma de la réaction colorimétrique permettant la mesure de l'activité superoxyde dismutase.....</i>	<i>75</i>
<i>Figure II 8: Schéma d'un incubateur pour les expériences d'inoculation en sol.....</i>	<i>78</i>
<i>Figure II 9: Concentrations aqueuses en BaP solubilisées par les filtrats de culture après 24h à température ambiante (ND = non déterminé).....</i>	<i>81</i>
<i>Figure II 10: Taux de dégradation d'une quantité initiale de 500 µg de BaP après 9 jours d'incubation dans 25 mL de MM1 (encadrées = souches présentant plus de 30% de dégradation du BaP en moyenne).....</i>	<i>82</i>
<i>Figure II 11: Analyse en composantes principales sur matrice de covariance des activités enzymatiques de dégradation des HAP chez les différentes souches en présence ou en absence de 500 µg de BaP sur 9 jours (en noire = souches dont le taux de dégradation moyen du BaP dépasse 30%).....</i>	<i>85</i>
<i>Figure II 12: Activités spécifiques de type manganèse-peroxydase dans les filtrats des souches sélectionnées après 9 jours de culture en présence ou en absence de BaP (encadrées = souches dont le taux de dégradation moyen du BaP dépasse 30%).....</i>	<i>87</i>
<i>Figure II 13: Activités spécifiques de type lignine-peroxydase dans les filtrats de culture après 9 jours de culture en présence ou en absence de BaP (encadrées = souches dont le taux de dégradation moyen du BaP dépasse 30%).....</i>	<i>88</i>

<i>Figure II 14: Activités spécifiques époxydase du cytochrome P450 dans les lysats cellulaires après 9 jours de culture en présence ou en absence de BaP (encadrées = souches dont le taux de dégradation moyen du BaP dépasse 30%).....</i>	<i>89</i>
<i>Figure II 15: Analyse en composantes principales sur matrice de coefficient de Pearson des activités enzymatiques du stress oxydant chez les souches en absence (a) et en présence (b) de 500µg de BaP sur 9 jours (en noire = souches dont le taux de dégradation moyen du BaP dépasse 30%).....</i>	<i>91</i>
<i>Figure II 16: Activités spécifiques de type superoxyde dismutase au sein des lysats cellulaires des souches après 9 jours de culture en présence ou en absence de BaP (encadrées = souches dont le taux de dégradation moyen du BaP dépasse 30%)</i>	<i>93</i>
<i>Figure II 17: Activités spécifiques de type glutathion peroxydase au sein des lysats cellulaires des souches après 9 jours de culture en présence ou en absence de BaP (encadrées = souches dont le taux de dégradation moyen du BaP dépasse 30%)</i>	<i>94</i>
<i>Figure II 18: Mise en relation des activités spécifiques moyennes de type catalase en présence et en absence de BaP dans les lysats cellulaires après 9 jours d'incubation (encadrées = souches dont le taux de dégradation moyen du BaP dépasse 30%)</i>	<i>95</i>
<i>Figure II 19: Pourcentages de dégradation des HAP totaux et par classe d'HAP 30 jours après inoculation des souches 5, S19 et 18 en sol B2 par rapport aux témoins.....</i>	<i>101</i>
<i>Figure II 20: Pourcentages de dégradation des HAP totaux et par classe d'HAP 30 jours après inoculation des souches 5, S19 et 18 en sol C6 par rapport aux témoins.....</i>	<i>103</i>
<i>Figure II 21: Pourcentages de dégradation des HAP totaux et par classe d'HAP 30 jours après inoculation de 18 et biostimulation en sol C6 par rapport aux témoins</i>	<i>105</i>
<i>Figure III 1: Etapes de l'acheminement des HAP d'un état adsorbé au verre vers les sites de dégradation fongiques</i>	<i>111</i>
<i>Figure III 2: Protocole de préparation d'un mycélium en phase active de croissance.....</i>	<i>115</i>
<i>Figure III 3: Comparaison des dispositifs des milieux non compartimentés et compartimentés</i>	<i>117</i>
<i>Figure III 4: Masses de phénanthrène (PHEN) et de BaP incorporées par la biomasse en milieu non compartimenté et compartimenté comparativement à leur solubilité aqueuse respective</i>	<i>120</i>
<i>Figure III 5: Marquage fluorescent bleu entraîné par le BaP au niveau des hyphes de Fusarium solani observé par trois techniques de microscopie. a = Microscopie à épifluorescence ; b = Couplage du contraste interférentiel et de la fluorescence en microscopie confocale ; c = Double marquage avec le marqueur pariétal Rouge Congo en microscopie confocale.....</i>	<i>122</i>
<i>Figure III 6: Localisation dans un même plan optique de trois molécules fluorescentes par microscopie confocale dans les cellules de Fusarium solani. a = BaP (canal 405 nm) ; b = Bodipy (488 nm) ; c = FM4-64 (561 nm) ; d = triple marquage</i>	<i>124</i>
<i>Figure III 7: Comparaison des marquages cellulaires entraînés par le BaP (a, d), le FM4-64 (b, e) et le Bodipy (c, f) dans les témoins (a, b, c) et en présence de 100 mM d'azoture de sodium (d, e, f) chez Fusarium solani</i>	<i>126</i>

<i>Figure III 8: Effets de trois concentrations en azoture de sodium (0, 5 et 100 mM) sur le marquage cellulaire dû au BaP en microscopie à épifluorescence au grossissement X400 (a-c) et après grossissement d'un détail de l'image 3,4 fois (d-f).....</i>	127
<i>Figure III 9: Cinétique comparative de l'incorporation du BaP (filtre 405 nm) et du FM4-64 (561 nm) dans les hyphes de Fusarium solani en microscopie à épifluorescence.....</i>	128
<i>Figure III 10: Comparaison des marquages cellulaires entraînés par le BaP (a-d) et le Bodipy (e-h) dans les témoins (a, b, e, f) et en présence de 0,1 g.L⁻¹ de cytochalasine B, un perturbateur du cytosquelette (c, d, g et h).....</i>	130
<i>Figure III 11: Schéma récapitulatif des hypothèses résultant de l'étude du mode d'incorporation des HAP chez le champignon filamenteux Fusarium solani.....</i>	131
<i>Figure III 12: Schéma récapitulatif des conséquences de l'application d'un inhibiteur métabolique (NaN₃) et d'un perturbateur du cytosquelette (cytochalasine B) sur la localisation cellulaire du BaP chez F. solani.....</i>	135

Table des tableaux

<i>Tableau i 1: Propriétés physico-chimiques des 16 HAP de la liste US EPA (ATSDR, 1995).....</i>	6
<i>Tableau i 2: Classification IARC des 16 HAP de la liste US EPA selon leur cancérogénicité (X = non classifié par l'IARC)</i>	7
<i>Tableau i 3: Réactions enzymatiques possiblement impliquées dans les mécanismes de dégradation des HAP chez les champignons.....</i>	21
<i>Tableau I 1: Etapes d'analyse des échantillons de sol</i>	26
<i>Tableau I 2: Positionnement et profondeur des échantillonnages au niveau du dépôt de bus du site de l'Union</i>	35
<i>Tableau I 3: Description macroscopique et identification génétique des isolats</i>	55
<i>Tableau I 4: Classification phylogénique des souches identifiées (source : Mycobank, 2013).....</i>	57
<i>Tableau II 1: Sélection des souches lors des étapes de la démarche expérimentale.....</i>	65
<i>Tableau II 2: Propriétés physico-chimiques du Benzo[a]pyrène (INERIS, 2006)</i>	65
<i>Tableau II 3: Plan expérimental de l'expérience de dégradation des HAP en sols historiquement contaminés (valeurs = nombres de réplicatas par condition)</i>	79
<i>Tableau II 4: Représentation des activités enzymatiques les plus informatives sous forme de scores pour les souches les plus efficaces et les moins efficaces dans la dégradation du BaP</i>	96
<i>Tableau II 5: Comparaison des propriétés physico-chimiques des sols B2 et C6.....</i>	104
<i>Tableau III 1: Compartiment cellulaire marqué par le Bodipy et le FM4-64 et processus impliqué dans leur incorporation.....</i>	113

Tableau III 2: Compartiments cellulaires marqués suite au traitement de F. solani par les fluorochromes FM4-64, Bodipy et BaP, et les inhibiteurs NaN₃ et cytochalasine B (= résultat non montré)..... 134*

Démarche scientifique de la thèse

Chapitre I								Chapitre II					Chapitre III			
Origine	Echantillon de sol	Documentation		Mesures physico-chimiques			Isolements fongiques	Echantillon de sol	Méthode d'isolement	Souche	Milieu Minéral			Sol	Milieu Minéral	Identification
		Historique	Géologie	Teneurs HAP	Pédologie	Rétention H ₂ O					Désorption du BaP	Dégradation du BaP	Activités enzymatiques	Dégradation des HAP	Incorporation du BaP	
								X	X	S19						<i>Fusarium solani</i>
Roubaix (Dépôt de bus)	A1							A1	Inoculation directe	1						X
	A2						2									
	A3								Suspension/ Dilution	3						X
	A4						4									<i>Penicillium canescens</i>
	A5						5									<i>Cladosporium cladosporioides</i>
	A6						6									X
	A7							A12	Suspension/ Dilution	7						<i>Penicillium roqueforti</i>
	A8						8									X
	A9							B2	Inoculation directe	9						X
	A10						10									X
	A11									11						X
	A12									12						<i>Fusarium solani</i>
	Dunkerque	A13							C2	Inoculation directe	13					
B1							14									X
B2								Suspension/ Dilution	15						X	
Roubaix (Usine à gaz)	C1								16							X
	C2						C6	Inoculation directe	17							
	C3								18							<i>Talaromyces helicus</i>
	C4								19							<i>Fusarium oxysporum</i>
	C5								20							<i>Humicola sp.</i>
	C6								21							<i>Bionectria ochroleuca</i>
	C7								22							<i>Cladosporium bruhnei</i>
	C8								23							X
	C9								24							<i>Cladosporium sp.</i>
Chambly	D									Suspension/ Dilution	25					
							26								<i>Trichoderma harzianum</i>	
							C9	Particule de sol	27							<i>Penicillium chrysogenum</i>
						D	28								X	
								Particule de sol	29							<i>Pseudallescheria sp.</i>
							30									<i>Mortierella alpina</i>